



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

25 MAYO 1998

TESIS DOCTORAL

[Handwritten signature]

ESTUDIO EPIFITÓTICO, POSIBILIDADES DE CONTROL DE LA ANTRACNOSIS DE FRESA EN EL S.O. DE ANDALUCÍA. CRITERIOS MORFOLÓGICOS, CULTURALES, BIOQUÍMICOS Y PATOGENÉTICOS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSAL.

Tesis Doctoral presentada por Berta de los Santos García de Paredes para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

DOCTORANDA

[Handwritten signature of Berta de los Santos García de Paredes]

Ecología
FAC. BIOLOGIA

el Dpto. Biología Veg y

15-06-98

27 Mayo

2018

DEPARTAMENTO.

DIRECTOR DE TESIS

[Handwritten signature of Dr. D. Fernando Romero Muñoz]

Dr. D. Fernando Romero Muñoz

[Handwritten signature of Prof. Dr. D. Santiago Silvestre Domingo]

Prof. Dr. D. Santiago Silvestre Domingo

TUTOR

[Handwritten signature of Prof. Dr. D. Santiago Silvestre Domingo]

- 6782 -

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	
AGRADECIMIENTOS	I
ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	V
RESUMEN	IX
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1.- La fresa	
2.1.1.- Historia	4
2.1.2.- Clasificación	5
2.1.3.- Características y composición química	5
2.1.4.- Fisiología del desarrollo	7
2.1.5.- Exigencias agroclimáticas	8
2.2.- Antracnosis en fresa	
2.2.1.- Antecedentes	10
2.2.2.- Fases de la enfermedad y síntomas	12
2.2.3.- Epidemiología	16
2.2.4.- Ciclo de la enfermedad	18
2.2.4.1.- Expresión de los síntomas	18
2.2.4.2.- Posibles fuentes de inóculo	21
2.2.4.3.- Diseminación de la enfermedad	24
2.2.5.- Estudios sobre medidas de control	25
2.2.5.1.- Medidas profilácticas	26
2.2.5.2.- Control químico	27
2.2.5.3.- Utilización de cultivares resistentes	33
2.2.5.4.- Otras medidas de control	39

2.3.- El género <i>Colletotrichum</i>	
2.3.1.- Clasificación	41
2.3.2.- Taxonomía específica	42
2.3.2.1.- <i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds	42
2.3.2.2.- <i>Colletotrichum fragariae</i> Brooks	43
2.3.2.3.- <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz).	43
2.3.2.4.- <i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.:Fr.)	44
2.3.2.5.- <i>Gloeosporium</i> spp..	45
2.3.3.- Métodos de identificación	46
2.3.4.- Factores que afectan al desarrollo del hongo	51

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Descripción de síntomas	
3.1.1.- Desarrollo de síntomas en ambiente controlado	53
3.1.1.1.- Podredumbre de corona	53
3.1.1.2.- Síntomas en estolones y peciolos	54
3.1.1.3.- Síntomas en frutos	54
3.1.2.- Desarrollo de síntomas en campo	55
3.2.- Caracterización del agente causal	
3.2.1.- Cultivos del hongo	56
3.2.2.- Características conidiales	56
3.2.3.- Producción del estado ascal	57
3.2.4.- Características de los apresorios	58
3.2.5.- Producción de quetas	58
3.2.6.- Características culturales y respuesta a la temperatura en patata dextrosa agar más extracto de levadura.	58
3.2.7.- Variaciones patogénicas entre los aislados	59
3.2.8.- Identificación mediante la utilización de anticuerpos monoclonales.	60
3.3.- Epidemiología	
3.3.1.- Experiencias en campo	61
3.3.2.- Toma de muestras	61
3.3.3.- Procesamiento de muestras de plantas en laboratorio	62
3.4.- Diseminación del patógeno	62

3.5.- Ciclo de la enfermedad	
3.5.1.- Expresión de los síntomas en campo	63
3.5.2.- Fuentes de inóculo	63
3.5.2.1.- Supervivencia en suelo	63
3.5.2.1.A.- Estudios de campo	63
3.5.2.1.B.- Experiencias en ambiente controlado	64
3.5.2.1.C.- Aislamientos de suelo	65
3.5.2.2.- Supervivencia del inóculo en plantas de fresa	66
3.5.2.3.- Huéspedes intermediarios	67
3.6.- Medidas de control	
3.6.1.- Control químico	67
3.6.1.1.- Fungotoxicidad "in vitro"	67
3.6.1.2.- Ensayos de control químico en ambiente controlado	68
3.6.1.3.- Estudio de la eficacia de fungicidas en condiciones de campo.	69
3.6.2.- Utilización de cultivares resistentes	71
3.6.3.- Control térmico	71
3.6.3.1.- Resistencia térmica del patógeno "in vitro"	72
3.6.3.2.- Experiencias de control térmico en ambiente controlado.	72
3.6.4.- Control biológico	73
3.6.4.1.- Estudio del potencial inhibitorio "in vitro"	73
3.6.4.2.- Análisis de la posible patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp. frente a plantas de fresa. Influencia sobre el desarrollo de la enfermedad en condiciones controladas.	73
3.6.4.3.- Fungotoxicidad "in vitro"	74
3.6.4.4.- Influencia en campo	74
3.7.- Análisis estadístico	74



4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Descripción de síntomas	
4.1.1.- Desarrollo de síntomas en ambiente controlado	76
4.1.1.1.- Podredumbre de corona	76
4.1.1.2.- Síntomas en estolones y peciolos	77
4.1.1.3.- Síntomas en frutos	77
4.1.2.- Experiencia en campo	78
4.1.2.1.- Caracterización de síntomas	78
4.2.- Identificación del aislado	
4.2.1.- Características conidiales	87
4.2.2.- Producción del estado ascal	87
4.2.3.- Características de los apresorios	88
4.2.4.- Producción de quetas	88
4.2.5.-Características culturales y respuesta a la temperatura en patata dextrosa agar más extracto de levadura.	90
4.2.6.- Variaciones patogénicas entre los aislados	95
4.2.7.-Identificación mediante la utilización de anticuerpos monoclonales.	102
4.3.- Epidemiología	104
4.4.- Diseminación del patógeno	109
4.5.- Ciclo de la enfermedad	
4.5.1.- Expresión de los síntomas en campo	111
4.5.2.- Fuentes de inóculo	114
4.5.2.1.- Supervivencia en suelo	114
4.5.2.1.A.- Estudios de campo	114
4.5.2.1.B.- Experiencias en ambiente controlado	116
4.5.2.2.- Supervivencia del inóculo en plantas de fresa	118
4.5.2.3.- Huéspedes intermediarios	125
4.6.- Medidas de control	
4.6.1.- Control químico	126
4.6.1.1.- Fungotoxicidad "in vitro"	126
4.6.1.2.- Ensayos de control químico en ambiente controlado	128

4.6.1.3.- Estudio de la eficacia de fungicidas en condiciones de campo.	132
4.6.2.- Utilización de cultivares resistentes	140
4.6.3.- Control térmico	
4.6.3.1.- Resistencia térmica del patógeno "in vitro"	143
4.6.3.2.- Experiencias de control térmico en ambiente controlado.	143
4.6.4.- Control biológico	
4.6.4.1.- Estudio del potencial inhibitorio "in vitro"	145
4.6.4.2.- Análisis de la patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp. frente a plantas de fresa. Influencia sobre el desarrollo de la enfermedad en condiciones controladas.	146
4.6.4.3.- Fungotoxicidad "in vitro"	147
4.6.4.4.- Influencia en campo	147
5.- CONCLUSIONES	150
6.- BIBLIOGRAFÍA	152

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. D. Fernando Romero Muñoz, Director de esta Tesis, por su ayuda, estímulo y orientación.

Al Director del Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Profesor Dr. D. Francisco García Novo, por facilitar la presentación de esta Tesis.

Al Profesor Dr. D. Santiago Silvestre Domingo y al Profesor Dr. D. Benito Valdes Castrillón, por el apoyo e interés mostrados en la elaboración y presentación de este trabajo.

A la Dirección General de Investigación y Formación Agraria, de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, que financió el proyecto de investigación que hizo posible este trabajo; en cuyo Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres - Tomejil" (Sevilla) se realizaron los trabajos presentados en esta Tesis; así como por las becas disfrutadas durante su realización.

Al Dr. D. Fernando Pliego y a su equipo del Centro de Investigación y Formación Agraria "Churrana" (Málaga), por su colaboración facilitando plantas de fresa procedentes de cultivo de meristemos.

Al Dr. D. Kelvin Hughes, por la valiosa información sobre técnicas serológicas.

A D. Juan Jesús Medina y a todas las personas que colaboraron en los trabajos de campo llevados a cabo en la Finca Experimental "El Cebollar" (Moguer-Huelva), dependiente del Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres - Tomejil".

A la Sociedad Agraria de Transformación "Grufesa", a Viveros "California" y a todos los agricultores y viveristas que facilitaron material vegetal para su estudio.

Finalmente, a todos mis compañeros del Laboratorio de Patología Vegetal del Centro de Investigación y Formación Agraria "Las Torres - Tomejil", por su aliento, ayuda y amistad.

ABREVIATURAS

ACR	"anthracnose crown rot", antracnosis podredumbre de corona.
CT-2	denominación del aislado tipo, obtenido en la provincia de Huelva
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
cv	cultivar de fresa
CC	Coefficiente de correlación
MDS	Mínima Diferencia Significativa
NS	No significativa
ppm	partes por millón
NPP	Número de propágulos de <i>Colletotrichum acutatum</i>
HR	Humedad Relativa
IS	Índice de Severidad
PBS_t	Tampón Fosfato más Tween 20
MAFF	Anticuerpo Monoclonal
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DE₅₀	Dosis Efectiva al 50%
PDA-Y	Agar Patata Dextrosa con Extracto de Levadura
DPA-Y	Agar Dextrosa Peptona con Extracto de Levadura
OMA	Agar Harina de Avena
AHF	Agar Hoja de Fresa
V8	Agar Ocho Vegetales

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Ciclo de la antracnosis en fresa originada por <i>Colletotrichum fragariae</i> (Propuesto por Howard y Albregts, 1984 b).	20
Figura 2.- Coronas necrosadas, en corte longitudinal, mostrando síntomas de ACR.	80
Figura 3.- Parte aérea de la planta mostrando síntomas severos de ACR.	81
Figura 4.- Fruto maduro mostrando síntomas de antracnosis en campo.	82
Figura 5.- Fruto maduro que presenta amplia superficie afectada con achenios necrosados.	83
Figura 6.- Fruto inmaduro mostrando síntomas de antracnosis	84
Figura 7.- Marchitamiento de la flor ocasionado por <i>Colletotrichum</i> spp..	85
Figura 8.- Mancha necrótica en hoja de fresa originada por <i>Colletotrichum</i> spp..	86
Figura 9.- Influencia de la temperatura en el crecimiento de los aislados.	93
Figura 10.- Influencia de las precipitaciones y temperaturas sobre el desarrollo de la enfermedad (1993 - 94).	106
Figura 11.- Influencia de las precipitaciones y temperaturas sobre el desarrollo de la enfermedad (1994 - 95).	107
Figura 12.- Influencia de las precipitaciones y temperaturas sobre el desarrollo de la enfermedad (1995 - 96).	108
Figura 13.- Influencia de las precipitaciones y temperaturas en la podredumbre de frutos.	110
Figura 14.- Incidencia de ACR y desarrollo fenológico del cultivo.	113
Figura 15.- Variación del NPP/g de suelo en condiciones de luz continua.	117
Figura 16.- En corte longitudinal, estado de las coronas de las que se aísla el patógeno.	125
Figura 17.- Comportamiento diferencial de la incidencia de ACR entre cultivares frente a fungicidas en invernadero.	130
Figura 18.- Incidencia de podredumbres de frutos.	139

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Límites máximos de residuos autorizados en frutos de fresa (B.O.E. 56)	32
Tabla 2.- Susceptibilidad de cultivares de fresa a distintas fases de la antracnosis en Florida (Howard et al., 1992).	34
Tabla 3.- Respuesta de cultivares de fresa a la infección con <i>Colletotrichum fragariae</i> (Delp y Milholland, 1981).	36
Tabla 4.- Respuesta de cultivares frente a <i>Colletotrichum fragariae</i> (Maas y Galletta, 1989).	38
Tabla 5.- Fuente y designación de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp..	57
Tabla 6.- Características morfológicas de los aislados.	89
Tabla 7.- Características culturales de los aislados.	91
Tabla 8.- Crecimiento miceliar de los aislados en distintos medios sólidos, tras siete días de cultivo a 25°C.	94
Tabla 9 A .- Respuesta de cultivares de fresa a la inoculación con distintos aislados de <i>C. acutatum</i> .	96
Tabla 9 B.- Respuesta de cultivares de fresa a la inoculación con distintos aislados de <i>C. acutatum</i> .	97
Tabla 10.- Respuesta de cultivares de fresa a la inoculación con distintos aislados de <i>C. fragariae</i> .	98

Tabla 11.- Respuesta de cultivares de fresa a la inoculación con distintos aislados de <i>C. gloeosporioides</i> .	100
Tabla 12.- Respuesta de cultivares de fresa a la inoculación con distintos aislados de <i>C. miyabeana</i> .	100
Tabla 13.- Respuesta de cultivares de fresa a la inoculación con distintos aislados de <i>C. coccodes</i> .	101
Tabla 14.- Respuesta de los aislados a anticuerpos monoclonales.	103
Tabla 15.- Incidencia de la enfermedad durante los tres años de experiencias.	111
Tabla 16.- Resultados de los aislamientos de muestras de suelo procedentes de la rizosfera de plantas muertas.	115
Tabla 17.- Resultados de los aislamientos de muestras de suelo procedente de la rizosfera de plantas recogidas al final de cada campaña.	116
Tabla 18.- Variación del NPP/g de suelo en experiencias en macetas.	117
Tabla 19 A.- Resultados de las prospecciones en planteras locales (1992).	118
Tabla 19 B.- Resultados de las prospecciones en viveros de altura (1992).	118
Tabla 20 A.- Resultados de las prospecciones preplantación en planteras (1993).	119
Tabla 20 B.- Resultados de las prospecciones preplantación en viveros de altura (1993).	120
Tabla 21.- Resultados de las prospecciones realizadas en fincas productoras de frutos de fresa en la provincia de Huelva (Octubre 1993 - Mayo 1994).	121

Tabla 22 A.- Resultados de las prospecciones realizadas en planteras locales (1994)	122
Tabla 22 B.- Resultados de las prospecciones realizadas en viveros de altura (1994).	123
Tabla 23 A.- Resultados de las prospecciones realizadas en planteras locales (1995)	124
Tabla 23 B.- Resultados de las prospecciones realizadas en viveros de altura (1995).	124
Tabla 24.- Efectividad de diferentes fungicidas frente a la formación de colonias y al crecimiento miceliar de <i>Colletotrichum acutatum</i> (CECT 20240)	128
Tabla 25.- Porcentajes medios de plantas muertas 30 días después del tratamiento con fungicidas, en condiciones de invernadero.	131
Tabla 26.- Porcentaje de mortalidad por ACR de plantas de fresa del cv. "Oso Grande", en condiciones de campo (Octubre - Noviembre).	133
Tabla 27.- Porcentajes totales de plantas de fresa del cv. "Oso Grande" muertas por ACR, en condiciones de campo.	135
Tabla 28.- Efecto de los tratamientos en la recuperación de <i>Colletotrichum acutatum</i> (CECT 20240) de corona de fresa.	137
Tabla 29.- Producción útil, en gramos por planta.	138
Tabla 30.- Respuesta de cultivares de fresa a la infección con <i>Colletotrichum acutatum</i> (CECT 20240).	142
Tabla 31.- Porcentaje de inhibición de la formación de colonias tras tratamientos por inmersión en baño termostatzado.	143

Tabla 32.- Tratamientos térmicos en invernadero, incidencia de ACR.	144
Tabla 33.- Producción (gramos/planta) tras tratamientos térmicos.	145
Tabla 34.- Efectividad de fungicidas frente a formación de colonias y crecimiento miceliar de <i>Fusarium</i> spp.	147
Tabla 35.- Efecto de los tratamientos en la recuperación de <i>Fusarium</i> spp. de tejidos de corona de fresa.	148

RESUMEN

Para el estudio de la antracnosis de fresa en Andalucía se han llevado a cabo diversos trabajos de campo, laboratorio y ambiente controlado que han tenido por objeto determinar:

- La caracterización de los síntomas.
- Los posibles agentes causales de la antracnosis en fresa mediante criterios morfológicos, culturales, patogénicos y serológicos.
- El estudio epidemiológico de la enfermedad.
- El ciclo del/los patógeno/s implicado/s en la ocurrencia de la antracnosis, así como, su incidencia y distribución.
- Las posibles medidas de control de la enfermedad.

Se consideró como zona de estudio más propicia a la provincia de Huelva, donde el cultivo del fresón adquiere mayor importancia a nivel nacional, con máximos tanto de superficie como de producción, y donde se había detectado la enfermedad.

Los primeros síntomas de podredumbre de corona (anthracnose crown rot, ACR) se detectan días después de la plantación, las plantas muertas no desarrollan hojas verdaderas, presentando yema marchita; al realizar cortes de corona se aprecia una decoloración marrón-rojiza seca que llega a afectar el 100% de la superficie. Los síntomas de ACR en plantas que ya han iniciado la fructificación se caracterizan por el decaimiento de las mismas, comenzando por la yema y progresando hacia fuera. Las primeras podredumbres de fruto maduro aparecen a mediados de Febrero, las lesiones se describen como manchas hundidas, firmes y circulares. Se han detectado síntomas de antracnosis en frutos verdes, flores y hojas.

Para la determinación del agente causal de antracnosis aislado en la provincia

de Huelva, que en inoculaciones artificiales reprodujo los síntomas característicos de antracnosis y que fue reaislado, se estudiaron distintos parámetros comparándose los resultados con los de diferentes aislados del género obtenidos del Instituto Micológico Internacional (I.M.I.). El aislado tipo se clasificó como perteneciente a la especie *Colletotrichum acutatum*. No se ha aislado ninguna otra especie del género y el resto de los obtenidos de fresas en Huelva se identificaron por medio de sus características morfológicas y culturales.

Los estudios morfológicos, culturales y patogénicos determinaron que ninguno de los parámetros por si solo es capaz de facilitar la identificación específica dentro del género *Colletotrichum*. Únicamente se puede afirmar que aquellos hongos que forman el estado perfecto pertenecen a la especie *C. gloeosporioides*.

El análisis serológico permite diferenciar del resto del género a los hongos de la especie *C. acutatum*

El desarrollo de la enfermedad en cualquiera de sus manifestaciones se ve favorecido por precipitaciones y temperaturas superiores a 25°C; desde que se inicia la primera floración hasta que comienza la fructificación la incidencia de la enfermedad disminuye, coincidiendo con los meses más fríos.

En el ciclo de la enfermedad indicar que el desarrollo de ACR sólo se observó en plantas que han contraído la infección antes de su plantación en los campos de producción.

El agente causal de antracnosis no se aísla de suelo libre de planta, ni de la rizosfera de plantas sanas; observándose, que los suelos infestados artificialmente no tienen capacidad infectiva, disminuyendo la cantidad de inóculo presente a lo largo del tiempo.

En las prospecciones encaminadas a la detección de posibles huéspedes intermediarios indicar que sólo se ha aislado el patógeno de hojas de arándano (*Vaccinium* spp.), cultivo de nueva introducción en la provincia de Huelva. Al ser inoculado artificialmente produjo síntomas de antracnosis en planta y fruto de fresa.

Parece ser que la única fuente de inóculo es la propia planta de fresa, que infectadas en los viveros, son portadoras del patógeno cuando se trasplantan a los campos de producción; si las condiciones ambientales, en los días siguientes a la iniciación del cultivo, son favorables se desarrolla ACR, provocando la muerte de las plantas. Algunas sobreviven manteniendo infecciones latentes que provocaran posteriormente la aparición de podredumbres en frutos, siendo estos fuente de inóculo secundario para nuevos brotes de la enfermedad, aunque no producen re-infecciones de tejidos internos que induzcan la posterior muerte de las mismas en Mayo y Junio.

En cuanto a los métodos de control ninguno de los fungicidas probados ha controlado en su totalidad a la enfermedad, siendo tiabendazol, carbendazima y bitertanol los que facilitaron un mejor control de ACR. La incidencia de las podredumbres de frutos no han disminuido de forma significativa con las aplicaciones realizadas, sólo lo fue en plantas libres de patógeno.

De todos los cultivares utilizados ninguno es resistente a todas las formas de los patógenos causales de antracnosis. La resistencia se ha evaluado en base a la incidencia de ACR en los cultivares inoculados artificialmente. Algunos se mostraron resistentes al patógeno detectado en Huelva, pero la posibilidad de la introducción de otras especies con distinta capacidad patogénica hace pensar que ningún cultivar debe ser utilizado de forma mayoritaria.

Los tratamientos térmicos, por inmersión de plantas en baños de agua caliente, a 50°C durante 10 minutos facilitaron el control de ACR en ambiente controlado, pero redujeron el vigor de las plantas, no siendo recomendable su aplicación en pre-plantación en campos de producción de fruto.

Durante los primeros años de experiencia en campo, la incidencia de ACR fue inferior a la esperada. Se detectó un hongo del género *Fusarium* en las plantas utilizadas; pero los estudios realizados no demuestran que se trate de un competidor del agente causal. La menor incidencia de la enfermedad se debe probablemente a las condiciones de sequía y a las temperaturas inferiores a 24°C que se produjeron desde finales de Octubre a mediados de Noviembre en esos años.

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

El cultivo de la fresa se introdujo en la provincia de Huelva en la década de los 60. Desde entonces se ha mantenido en continua expansión debido a su elevado rendimiento económico. Los mayores beneficios se obtienen por la exportación de frutos, favorecida por la precocidad, y avalada por una alta calidad y productividad. Todo esto unido a su carácter social, por la enorme cantidad de mano de obra que emplea hacen de la fresa un cultivo muy importante para Andalucía.

La antracnosis se define como una enfermedad de las plantas que se caracteriza por ocasionar lesiones oscuras y ligeramente hundidas. En la fresa se originan síntomas en toda la parte aérea de la planta: estolones y peciolos (Brooks, 1931); podredumbre de corona que ocasiona la muerte de la planta (Brooks, 1935), podredumbre de frutos (Sturgess, 1954; Wright et al., 1960; Maas, 1978), marchitez de las flores (Howard et al., 1992) y manchas en hojas (Howard y Albrechts, 1983; Howard et al., 1992).

Esta enfermedad se detectó por primera vez en Estados Unidos (Brooks, 1931), extendiéndose a todos los lugares en los que se cultiva la fresa: Europa (García Jiménez, 1983; Gullino et al., 1985; Faedi et al., 1991; Denoyés-Rothan et al., 1996), Asia (Okayama, 1991), Oceanía (Sturgess, 1954; McGechan, 1977) y América Latina (Carvalho y Cardoso, 1964; Henz et al., 1992). La antracnosis de la fresa se considera como un serio problema ya que afecta directamente a la rentabilidad de las cosechas, al provocar pérdida de plantas y de frutos.

La antracnosis de fresa se describió inicialmente afectando a estolones y peciolos, determinándose que el agente causal era un hongo del género *Colletotrichum* y al que se denominó *C. fragariae* (Brooks, 1931). Posteriormente se han descrito otras especies del género como inductores de la enfermedad: *C. acutatum* (McGechan, 1977; Smith, 1986 y LaMondia, 1991), *C. gloeosporioides* (Howard y Albrechts, 1984 a) y *C. dematium*, considerado este último menos virulento que los anteriores (Beraha y Wright, 1973). Todos ellos originan síntomas de características similares. Existen grandes dificultades a la hora de identificar las distintas especies (Sutton, 1992),

llegando algunos autores a considerar la existencia del llamado complejo "Colletotrichum" (Howard et al., 1992).

A lo largo del tiempo se ha intentado completar el ciclo de estos patógenos analizando: la existencia de posibles huéspedes intermediarios (Brooks, 1931; Howard y Albregts, 1973; Delp y Milholland, 1981; Gullino et al., 1985 y Maas y Howard, 1985), si se trata o no de patógenos de suelo (Horn y Carver, 1963; Eastburn y Gubler, 1990) y considerando la posibilidad de que la única fuente de inóculo sea la propia planta de fresa (Horn y Carver, 1968; Howard, 1972; Howard y Albregts, 1984 b; McInnes et al., 1992)

El desarrollo epidemiológico de la antracnosis en fresa ha sido objeto de estudio a lo largo del tiempo; su conocimiento ha resultado de gran importancia en cada una de las regiones donde se presenta la enfermedad (Brooks, 1935; Sturgess, 1954; Carver y Horn, 1960; Horn y Carver, 1968; Howard, 1972; McGechan, 1977; Delp y Milholland, 1980 b; Howard y Albregts, 1984 b; Okayama, 1991; Henz et al., 1992).

Para el control de la antracnosis en fresa se ha estudiado el efecto de aplicaciones de fungicidas (Brooks, 1931; Carver y Horn, 1960; Howard, 1971; Horn et al., 1972; Delp y Milholland, 1980 a; Gullino et al., 1985; Gubler et al., 1988; Smith y Black, 1991; Denoyés-Rothan et al., 1996), así como de tratamientos térmicos sobre la planta (Gubler et al., 1988). Se ha analizado la repuesta de resistencia a los patógenos de cultivares de fresa (Horn et al., 1972, Figueredo et al., 1972; Delp y Milholland, 1980 b; Delp y Milholland, 1981; Smith y Spiers, 1982; Smith y Black, 1987; Smith y Black, 1990 b; Faedi et al., 1991; Gupton y Smith, 1991; Howard et al., 1992; Denoyés-Rothan et al., 1996); habiéndose desarrollado algunos estudios sobre control biológico de distintos hongos del género *Colletotrichum* (Jeffries y Koomen, 1992; Koomen y Jeffries, 1993; Bankole y Adebajo, 1996).

Al inicio de este trabajo la incidencia de antracnosis en la provincia de Huelva era baja, pero una vez detectada y conocidos sus efectos sobre el cultivo, pérdidas importantes en plantas y frutos; unido a las dificultades en el control y a la controversia existente en cuanto a la diversidad específica de sus agentes causales y su

diferente comportamiento según la zona de cultivo, se decidió la realización de esta tesis que tiene como objetivos:

- Caracterizar los síntomas de la enfermedad.

- Identificar los posibles agentes causales de la antracnosis en fresa mediante estudios morfológicos, culturales, patogénicos y serológicos.

- Realizar el estudio epidemiológico de la enfermedad.

- Determinar el ciclo del/los patógeno/s implicado/s en la ocurrencia de la antracnosis, así como su incidencia y distribución.

- Analizar las posibles medidas de control de la enfermedad.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- LA FRESA

2.1.1.- HISTORIA

La fresa es una planta conocida y apreciada desde la antigüedad. Las primeras referencias datan del tiempo de los romanos, autores como Plinio la citan distinguiéndola por su sabor, aplicándole el apelativo de "fragum" (Maroto y López, 1988).

Hasta muy entrado el siglo XV no se conocía en el continente europeo otro fresal que el silvestre, denominado *Fragaria vesca*, que ofrecía un fruto pequeño de poco interés. Tras años de cultivo y por medio de cruces naturales el fruto ha incrementado su tamaño. A partir del siglo XVI hay constancia de la aparición de otras especies europeas como *F. moschata* Duch o *F. viridis* Duch (Juscafresa e Ibar, 1987).

Tras el descubrimiento de América se conocen nuevas especies propias de este continente, que son introducidas en Europa a finales del siglo XVII y principios del XVIII; destacando *F. chiloensis*, originaria de Chile y *F. virginiana*, procedente de Virginia, entre las que se dieron hibridaciones fortuitas originándose *F. ananassa* de características intermedias, frutos grandes y el vigor propio de la primera, unidos al mayor número de flores y firmeza de frutos típicos de la segunda. A partir de estas y mediante programas de mejora genética se han obtenido un gran número de variedades, adaptadas a distintas circunstancias climáticas y edafológicas, respondiendo no sólo a una alta productividad sino también a la mejora de otras características: frutos de gran calibre para facilitar la recolección, buena calidad gustativa, firmeza, color, precocidad, índices elevados de estolonamiento, adaptación al medio físico, ... (Juscafresa e Ibar, 1987; Maroto y López, 1988). Desde mediados de los ochenta, la tendencia de los programas de mejora, tanto en Europa como en EEUU ha sido la búsqueda de resistencia a enfermedades (Maroto y López, 1988).

En España el cultivo de la fresa se inicia en pequeños huertos de Valencia en el siglo XVI. A mediados de la década de los sesenta, comienza a implantarse el cultivo extensivo utilizando variedades importadas de California (EEUU). En la actualidad existen cuatro grandes zonas productoras: Andalucía Occidental, Andalucía

Oriental, Levante y Cataluña, utilizándose una alta tecnología y avanzada comercialización (Maroto y López, 1988). Siendo en la provincia de Huelva donde el fresón adquiere mayor importancia a nivel nacional, con máximos tanto de superficie como de producción. Según el Anuario de Estadísticas Agrarias y Pesqueras de Andalucía (1994), en 1992 la superficie dedicada al cultivo en dicha comunidad fue de 5.430 Has., de las cuales un 96% correspondían a la provincia de Huelva, con una producción de 189.705 Tm.; generando una media anual de 670,27 jornales directos por Ha.

2.1.2.- CLASIFICACIÓN

Las fresas y los fresones se incluyen en el Orden Rosales, Familia Rosácea, género *Fragaria*. Existen especies oriundas de Europa, como *F. vesca* L. (2n=24), *F. moschata* Duch (2n=42) y *F. viridis* Duch (2n=14), de frutos pequeños o "fresas", y especies americanas como *F. chiloensis* Duch (2n=56) y *F. virginiana* Duch (2n=56), de frutos grandes y de cuyos cruzamientos derivan los actuales cultivares de "fresón", que suelen ser conocidos como *Fragaria x ananassa* Duch (Maroto y López, 1988).

2.1.3.- CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las plantas poseen un sistema radicular fasciculado constituido por un gran número de raíces y raicillas no muy profundas, el 70% de ellas viven entre los siete y ocho primeros centímetros del suelo, el 20% llega a los quince, siendo muy difícil que alcancen los treinta centímetros (Salas y Domínguez, 1985).

Este sistema radicular está integrado por estructuras de raíces perennes con cambiums vascular y suberoso, y un sistema de raicillas nutricias, agrupadas en ramificaciones laterales, de corta vida y que carecen de tejido cambial (White, 1927). Las raicillas pueden vivir desde unos pocos días hasta semanas, las nuevas son emitidas en sucesivos planos superiores de las coronas, constituyendo todo ello un proceso natural que puede ser alterado por factores como la falta de agua o aire en el

suelo, presencia de patógenos radiculares o cambios en la capacidad de la parte aérea para proveer la energía necesaria para continuar el proceso de forma normal.

El tallo está constituido por un eje corto (2-3 cm), no ramificado y semejante a un cilindro que recibe el nombre de corona, sobre el que se observan numerosas escamas foliares. Este puede dividirse dando lugar a varias coronas hijas. En el estadio de crecimiento vegetativo, el meristemo apical produce nuevas hojas y yemas.

De la corona pueden partir, en respuesta a fotoperiodos largos y a través de yemas axilares, unas ramificaciones laterales denominadas estolones, que se caracterizan porque poseen nudos muy distanciados entre sí. Las raíces primarias de la planta hija aparecen en el segundo nudo del estolón, a la vez que lo hace la primera hoja. La producción de estolones es el método más utilizado para la multiplicación de plantas de fresa.

Las hojas aparecen en roseta y se insertan en la corona. Son de peciolo largo y provistas de dos estipulas rojizas. Su limbo está dividido en tres folíolos pedicelados, de bordes aserrados y con el envés pubescente, presentando un gran número de estomas en comparación con otras plantas (Maroto y López, 1988). Una hoja de fresa puede vivir normalmente de uno a tres meses siendo reemplazada durante el periodo de actividad vegetativa; se ha demostrado que existe una relación directa entre el número de hojas y la productividad de la planta (Roudeillac y Veschambre, 1987).

Las inflorescencias se inician en yemas terminales del tallo o en una ramificación de la corona en posición axilar, y siempre como respuesta a fotoperiodos cortos. Las flores son actinomorfas, dotadas de un involucro bracteal subcalicino, cáliz gamosepalo (de número variable), y de cinco a seis pétalos blancos. Presentan de veinte a veinticinco estambres y varios cientos de óvulos. La polinización suele ser alógama y entomófila .

El óvulo fecundado evoluciona hasta convertirse en un fruto poliaquenio. La forma de la infrutescencia es variable: cónica, deprimida, globulosa, esférica,... En una primera fase el color del fruto es verde claro, después blanco, tornándose en su madurez desde rosa claro a violeta oscuro. Su peso, en los cultivares modernos, puede

oscilar entre diez y treinta gramos. La duración del período entre fertilización y fruto maduro depende, fundamentalmente, de la temperatura habida durante el mismo, estimándose como término medio en treinta días (Maroto y López, 1988).

2.1.4.- FISIOLOGÍA DEL DESARROLLO

En el desarrollo de la planta de fresa se distinguen las siguientes fases:

A.- Reposo vegetativo. Estadío en el que hay poco crecimiento foliar y se observan hojas rojizas y secas. Responde a fotoperiodo mínimo y bajas temperaturas. Sucede en los meses de Noviembre a Diciembre.

B.- Iniciación de la actividad vegetativa, manifestada por la aparición de brotes turgentes y formación incipiente de hojas en estado rudimentario. Se produce en Enero o Febrero.

C.- Botones verdes, observándose estos entre las hojas en estado rudimentario.

D.- Botones blancos, apreciándose estos de forma ostensible sin que los pétalos se hayan desplegado. Si no se utiliza el sistema de forzado este estadío se alcanza entre Febrero y Marzo.

E.- Inicio de floración, cuando se constatan de tres a cinco flores abiertas por planta.

F.- Plena floración, el 50% de las flores están abiertas.

G.- Finaliza la floración, se inicia al observarse la caída de los pétalos y el cuajado de los frutos.

H.- Fructificación. Cuando los frutos verdes son claramente visibles.

Con las variedades normalmente cultivadas se produce desde Marzo una reiteración de las fases D y H, con algún solapamiento en el tiempo.

Este es un modelo teórico en el que se debe incluir una última fase que corresponde a temperatura y fotoperiodo máximo (verano) en el que disminuye la floración y aumenta el estolonado. El comportamiento de un cultivar varía como resultado de la interacción de su carácter genético y las características medio-ambientales (Veschambre, 1977). En la zona productora de Huelva este comportamiento varía, fundamentalmente, dependiendo de la dulzura de las

temperaturas invernales que permiten una actividad vegetativa casi ininterrumpida a lo largo de todo el año, siendo en realidad los factores limitantes el fotoperiodo y en especial las altas temperaturas veraniegas. En estas circunstancias, el parámetro que determina la pauta de comportamiento es el número de horas de frío que la planta recibe durante la fase A, ya que para lograr buenas producciones es necesario, con alguna variación según los cultivares, que la planta este sometida al menos siete horas diarias a temperaturas inferiores a 7°C. Con lo que se presenta una situación contradictoria, ya que en esta zona no se dan esas condiciones, siendo necesario que se proporcionen las horas frío en latitudes con características climáticas tales que propicien una temprana latencia otoñal. Una vez cumplido este propósito la planta se traslada a zonas más cálidas donde esa latencia puede romperse fácilmente, desplazándose su ciclo evolutivo en varios meses en el sentido de la precocidad. En la práctica se lleva a cabo con la producción de estolones en los llamados viveros de altura, ubicados en la Submeseta Norte (Maroto y López, 1988).

La práctica habitual en la zona de Huelva es la plantación otoñal con planta fresca, recién extraídas de viveros de altura donde han satisfecho sus horas de frío. En estas circunstancias se rompe la latencia y comienza rápidamente la actividad metabólica, sobreviniendo la primera floración en Diciembre y los primeros frutos a finales de Enero. En las zonas más tempranas la cosecha se puede prolongar hasta Junio, cuando las altas temperaturas unidas al amplio fotoperiodo inhiben la floración, continuando la planta su vegetación mientras su sistema radicular se lo permite (Maroto y López, 1988). Usualmente el cultivo es anual, aunque surge una cierta tendencia a mantenerlo un segundo año.

2.1.5.- EXIGENCIAS AGROCLIMÁTICAS

La fresa es una planta que se adapta a gran variedad de climas como lo prueba el hecho de que se encuentra en estado silvestre entre los 15 y 55° de latitud, tampoco la altitud constituye un factor limitante, pues se cultiva desde el borde del mar hasta los 1200 - 1500 m (Pérez, 1979).

Sin embargo, esto no permite realizar su cultivo en cualquier zona, ya que esta

capacidad de acomodación se refiere a su aspecto vegetativo y no a órganos fructíferos, base de su valor comercial. Temperaturas inferiores a -2°C originan daños en flores y frutos; temperaturas altas provocan un exceso de cosecha y planchado de los frutos (Maroto y López, 1988).

La formación de flores está ligada a las necesidades de fotoperiodo, siendo las variedades reflorecientes (varias cosechas al año) propias de días largos y las no reflorecientes (una cosecha al año) de días cortos; existiendo otro grupo de plantas indiferentes al fotoperiodo que se denominan de "día neutro" (Bringhurst y Voth, 1980). Aunque esta clasificación es extensamente aceptada parece ser que existen importantes interacciones "cultivar - fotoperiodo - temperatura" (Durner et al., 1984).

En general, todos los terrenos sueltos y bien drenados son aptos para el cultivo, siendo más aconsejables los areno-limosos o limo-arenosos, con buena capacidad de retención. En suelos de textura arcillosa debe asegurarse la eliminación de los excesos de agua. Son suelos favorables los limos de llanura, arenas ricas en humus, arenas gruesas y los suelos ricos en hierro. Deben evitarse los suelos salinos y los calizos, por la sensibilidad que el cultivo presenta a los mismos, de manera que valores de conductividad eléctrica superiores a 0,5 - 1,0 mmhos afectan negativamente a la producción (Salas y Domínguez, 1985).

La fresa vegeta adecuadamente entre valores de pH 6 a 7, siendo el óptimo 6,5. Terrenos con pH 5,5 sustentan perfectamente al cultivo, mientras que suelos básicos provocan carencias en microelementos.

Como causa generalizada de los problemas de salinidad, el agua ha de tener una gran calidad, conductividades eléctricas superiores a 0,8 - 1,0 mmohs x cm provocan deterioros en las cosechas.

2.2.- ANTRACNOSIS EN FRESA

2.2.1.- ANTECEDENTES

El término antracnosis comenzó a ser utilizado por Brooks (1931) para describir una nueva enfermedad de la fresa observada durante 1926 en viveros de Florida (EEUU), caracterizada por la presencia de manchas y estrangulamientos en estolones, viéndose ocasionalmente afectados los peciolos. Determina que el organismo causal es un hongo del género *Colletotrichum* al que denomina *C. fragariae*. A partir de ese momento el término se utiliza para identificar a todas las enfermedades de la fresa causadas por especies de dicho género. Posteriormente, el mismo autor, indica que el patógeno, durante el verano, provoca podredumbres secas de corona seguidas de decaimiento y muerte de la planta (Brooks, 1935)

A principios de la década de los cincuenta, Sturgess (1954) detecta en Australia una podredumbre de fruto maduro asociada a la presencia de manchas en peciolos similares a las descritas por Brooks. En 1957, el mismo autor describe la enfermedad en fruto como antracnosis e indica que está causada por un hongo del género *Gloeosporium*, muy relacionado con *C. fragariae* B..

En 1958, se observan en Louisiana (EEUU) frutos con manchas comparables a las descritas por Sturgess y originadas por *Gloeosporium* (Wright et al., 1960). Años más tarde, se vuelve a aislar *Gloeosporium* sp. de frutos y estolones con síntomas de antracnosis en Maryland (EEUU) (Maas, 1978).

En 1960, se detecta por primera vez en Louisiana, podredumbre de corona en viveros (Carver y Horn, 1960). Posteriormente se observa la muerte de plantas en campos de producción a finales de primavera, no determinándose cuál era el agente causal (Horn y Carver, 1962). Más tarde se identifica al patógeno como *C. fragariae* B., al que en principio se considera un hongo de suelo por aparecer las lesiones de la corona en la línea del mismo (Horn y Carver, 1963).

A finales de los sesenta, se observó en plantaciones de Florida (EEUU) y sobre cultivares procedentes de California (EEUU) unas podredumbres en fruto

maduro de las que se aísla consistentemente *C. fragariae* B.. Mediante inoculaciones cruzadas los autores llegan a la conclusión de que el mismo patógeno origina podredumbre de fruto, estrangulamiento de estolones y muerte de la planta (Howard, 1972).

En 1973 se detecta, en Michigan (EEUU), *C. dematium* causando antracnosis en frutos de fresa, siendo menos virulento que *C. fragariae* B. (Beraha y Wright, 1973).

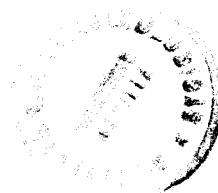
A mediados de los años setenta, surge en Florida una nueva enfermedad de las hojas que afecta a las plantas de fresa en verano. De estas manchas se aísla un hongo identificado como *C. fragariae* B. (Howard y Albregts, 1983).

Hasta 1980, *C. fragariae* B. era considerado el único hongo del género que causaba lesiones en fruto en la zona de Florida, a partir de este momento se comenzó a aislar en un porcentaje muy bajo *Glomerella cingulata* ((Stonem) Spauld y Schrenz), teleomorfo de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Howard y Albregts, 1984 a). La forma imperfecta de este hongo es detectada en Ohio (EEUU) afectando a frutos, no observándose síntomas en ninguna otra parte de la planta (Ellis y Bulger, 1986).

En varias zonas de Estados Unidos, a mediados de los ochenta, se descubre una nueva especie de *Colletotrichum* que afecta a frutos, estolones y corona de fresa, se identifica como *C. acutatum* Simmonds (Smith, 1986). Este hongo había sido descrito como agente causal de antracnosis en fruto maduro de fresa en Australia, casi una década antes (McGechan, 1977). Posteriormente, se detecta esta especie en Connecticut (EEUU), afectando a fruto maduro y indicándose que experimentalmente provoca la aparición de síntomas en frutos verdes (LaMondia, 1991).

La enfermedad se ha ido extendiendo al resto de los países en los que se cultiva la fresa, así en Brasil se observó *C. fragariae* B. originando estrangulamiento de estolones y podredumbre de corona en 1963 (Carvalho y Cardoso, 1964) y *C. acutatum* S. en 1989 (Henz et al., 1992).

En Japón se identifica *C. fragariae* B. en 1967, y desde la década de los



ochenta se ha convertido en un grave problema para el cultivo de la fresa. En 1988, se descubren peritecios en plantas enfermas y se determina el patógeno como *Glomerella cingulata* (Ston.) Spauld y Schrenk (Okayama, 1991).

En 1985 se detecta *C. gloeosporioides* en Italia, identificándose como agente causal de la podredumbre negra del fruto (Gullino et al., 1985). Posteriormente, se observó *C. acutatum* S. causando podredumbres de fruto en campos de producción y ataques a peciolas y estolones en viveros (Faedi et al., 1991).

En 1981, en Francia, se detectó antracnosis en fruto afectando a todas las variedades utilizadas normalmente. En 1985, se constataron podredumbres de corona, que en la campaña 1989-90 se convirtieron en un grave problema debido a condiciones medioambientales especialmente favorables. Se identificaron dos especies del género: *C. acutatum* S. y *C. gloeosporioides* (Denoyes-Rothan et al., 1996).

La primera referencia a antracnosis en España data de 1980, año en que se detectó un hongo identificado como *C. gloeosporioides* afectando a frutos de fresa en la provincia de Málaga. (García Jiménez, 1983).

Romero (1987) observó por primera vez en la provincia de Huelva síntomas en plantas y frutos de fresa originados por *Colletotrichum* sp.. Desde esa fecha se viene constatando su presencia con diferente intensidad en toda la zona de cultivo (Santos y Romero, 1995).

2.2.2.- FASES DE LA ENFERMEDAD Y SÍNTOMAS

El término **antracnosis** es el nombre común que se da a una serie de enfermedades de las plantas que se caracterizan por la aparición de lesiones oscuras y ligeramente hundidas. En fresa tiene diversas manifestaciones, aplicándose el término a todas las fases, pero reservándose a menudo para las lesiones en estolones y peciolas. El resto se describen por la identificación de los síntomas, es decir, podredumbre de corona, mancha negra de las hojas, marchitez de la flor, etc. (Howard et al., 1992).

Brooks (1931) define las características de la antracnosis en **estolones** y **peciolos**, en condiciones de campo: manchas hundidas, de tonalidad marrón-oscuro a negra y perfectamente delimitadas respecto al tejido sano circundante. En su inicio son marrón-oscuros y ovales, de 1 - 2 mm de longitud. Con el tiempo se incrementan lateral y longitudinalmente hasta que estrangulan el estolón o peciolo, llegando en los casos más extremos a afectarlos en su totalidad, por lo general las lesiones llegan a alcanzar 1 o 2 cm. El cortex infectado, en la región más vieja de la lesión toma color púrpura y sobre la superficie aparecen grupos de "quetas", definidas como hifas de color oscuro, que en determinadas condiciones surgen del acérvulo y que no tienen función reproductora (Müller y Loeffler, 1976).

En su descripción Howard y colaboradores (1992), indican que cuando la necrosis estrangula al estolón la planta hija no enraizada comienza a decaer y muere. Cuando un peciolo resulta estrangulado, la hoja se torna de color marrón y muere. Si la lesión se forma en la base del peciolo provoca que la hoja cuelgue, manteniéndose viva y verde durante un largo período de tiempo.

La **podredumbre de corona**, llamada en la literatura anglosajona "anthracnose crown rot" (ACR) se caracteriza por aparecer, en corte de corona, como una podredumbre seca de color marrón-rojizo y por provocar el decaimiento y muerte de la planta (Brooks, 1935).

Según Horn y Carver (1963), el síntoma inicial es una decoloración marrón con forma de mancha irregular de varios milímetros de diámetro, aproximadamente de uno de profundidad y con una o varias localizaciones en el tallo o corona. Para estos autores el punto de penetración del hongo se encuentra a nivel del suelo y la infección progresa lateral y verticalmente. Una vez que el hongo ha penetrado en el área vascular esta aparece de color marrón-rojizo, provocando el rápido decaimiento de la planta. Las coronas infectadas quedan acorchadas, tanto que una ligera presión provoca su rotura. Finalmente, se ve afectada en su totalidad y la planta muere.

Para Delp y Milholland (1980 b) y Denoyés-Rothan y colaboradores (1996), la penetración del hongo en los tejidos de la corona se produce desde lesiones en estolones o peciolos, o cuando un número suficiente de esporas traídas por la lluvia o

el viento germina sobre la yema central.

Howard y colaboradores (1992) indican que la coloración rojiza en los tejidos internos es característica de la antracnosis, mientras que si este matiz de color no aparece y se observa sólo un marrón oscuro estará provocada por otro organismo.

Desde el punto de vista externo los síntomas tienen un cierto parecido con los causados por *Verticillium* spp.. Se inicia con el decaimiento foliar, comenzando por la yema y progresando hacia fuera (Plakidas, 1964).

Milholland (1982) estudia los cambios producidos en las células y tejidos infectados por *Colletotrichum fragariae* y explica, en el caso de cultivares susceptibles, la reacción a la infección como caracterizada por el crecimiento intra y extracelular del hongo en el cortex y en los tejidos vasculares, resultando en el colapso celular y necrosis. Si el cultivar es resistente, el hongo permanece confinado en unas pocas células en el punto de la infección después de al menos 21 días.

La **podredumbre de yemas** se desarrolla en las plantas pocos días después del trasplante o semanas más tarde cuando se ha establecido y no ha formado múltiples coronas. En las yemas infectadas aparecen unas podredumbres de color marrón oscuro a negro. Las plantas que tienen un solo meristemo apical infectado mueren al ser plantadas. La podredumbre, generalmente, se desarrolla en una única yema en el caso de individuos con múltiples coronas, de forma que puede suceder que la planta completa muera cuando la podredumbre progresa o bien que sólo quede afectada esa corona mientras que el resto se mantiene viva. Masas de conidias de *Colletotrichum* se encuentran sobre los tejidos infectados cuando son diseccionados. En corte longitudinal se aprecia una fina línea de demarcación entre la zona sana, que no presenta coloración marrón-rojiza, y la yema infectada (Howard et al., 1992).

La primera **podredumbre de frutos** considerada como antracnosis es la descrita por Sturgess en 1954. Las lesiones, que sólo aparecen sobre frutos totalmente maduros y nunca sobre verdes, aunque estén sujetos a infección; se caracterizan por la formación de áreas ligeramente deprimidas, de tono bronceado a marrón oscuro. Masas de esporas de *Colletotrichum*, de color rosa se localizan con microscopía óptica

sobre la superficie afectada. La infección se inicia en cualquier punto del fruto y frecuentemente aparece más de una mancha. Al final del proceso el fruto se momifica, no siendo usual que se aislen organismos saprofitos. Las podredumbres de fruto originadas por *C. dematium*, *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. acutatum* son esencialmente similares (Wright et al., 1960; Howard, 1972; McGechan, 1977; Maas, 1978 y Denoyés-Rothan et al., 1996).

Howard y colaboradores (1992) indican que en el caso de cultivares muy susceptibles los frutos verdes pueden verse afectados si la podredumbre es severa en campo, algo a lo que ya habían hecho referencia Ellis y Bulger en 1986. En este caso las lesiones son duras, de color marrón oscuro a negro, similares a las causadas por *Rhizoctonia* spp., de las que se diferencia por presentar a microscopía óptica una esporulación rosada sobre la mancha.

La fase de la enfermedad denominada **mancha negra de las hojas**, se caracteriza por la aparición de necrosis redondeadas, usualmente de color negro, ocasionalmente gris claro de 0,5 a 2 mm de diámetro, que no provocan la muerte de la hoja aunque se encuentren en un número elevado. A veces tienen un aspecto húmedo en los primeros momentos de su desarrollo y suele presentarse en viveros, bien asociada a antracnosis en peciolas y estolones o como un signo de la posterior aparición de estos (Howard y Albrechts, 1983).

Sobre hoja se describe otro tipo de síntoma al que Howard y colaboradores (1991) denominan **mancha irregular**. Está caracterizado por la aparición de lesiones secas, de color marrón oscuro a negro en los márgenes y puntas de los folíolos. Varían en tamaño desde aquellas que se extienden 3 mm a lo largo del margen y 1,5 mm hacia el centro de la hoja, hasta las que se desarrollan 15 mm a lo largo del margen y hacia el centro. Las lesiones presentan formas variables pero tienden a ser alargadas y de bordes irregulares.

Las flores y los botones florales de algunos cultivares son muy susceptibles a la antracnosis y pueden aparecer infectados en todo el ciclo de desarrollo. Cuando el botón emergente es infectado, los sépalos se secan y oscurecen. Este síntoma es similar al originado por una excesiva fertilización. Si el botón floral es infectado

cuando el pedúnculo ha comenzado la elongación, se forma una lesión oscura bajo el cáliz que se extiende al pedúnculo. Finalmente el botón se seca y toma un color marrón claro, antes o después de la apertura de la flor. En estadios tempranos la lesión es similar a la originada por *Rhizoctonia* spp., excepto en el matiz de color, ya que este patógeno origina un tono púrpura. Cuando una flor abierta es infectada los pistilos y los óvulos se vuelven negros y el cáliz y una porción del pedúnculo aparecen marrón claro y se secan. Con frecuencia se pueden observar masas gelatinosas sobre las zonas infectadas de la flor o el pedúnculo, que aparentemente son exudados de la planta y que a veces contienen conidias de *Colletotrichum*. Los pedúnculos toman un color rojo claro, en el punto de la infección, incluso antes de que sea visible la lesión. Esta sintomatología no es diagnóstico de antracnosis, ya que otros organismos e incluso determinadas condiciones medioambientales pueden provocarla (Howard et al., 1992).

2.2.3.- EPIDEMIOLOGÍA

Distintos autores coinciden en indicar que los factores ambientales que favorecen un rápido desarrollo de la enfermedad en fresa, en cualquiera de sus manifestaciones, son temperaturas de 24°C o superiores y alta humedad relativa (Brooks, 1935; Sturgess, 1954; Carver y Horn, 1960; Howard, 1972; McGechan, 1977; Okayama, 1991 y Henz et al., 1992).

Sturgess (1957), analiza la influencia de la temperatura y de la duración de las condiciones de alta humedad en campo en relación con la incidencia de antracnosis en fresa. Indica que se requiere un período suficiente de humedad libre sobre la superficie del fruto para que se origine la infección y posterior desarrollo de la enfermedad. Sugiere que por sí solas la ocurrencia de temperaturas favorables y de lluvias no son suficientes para ocasionar podredumbres de frutos.

La producción de esporas, la germinación y la posterior infección de los frutos de fresa son favorecidos por la lluvia y un ambiente cálido y húmedo. Las esporas requieren cerca de un 100% de humedad relativa para germinar. La infección, el desarrollo de las lesiones y la producción secundaria de esporas se desarrollan rápidamente bajo condiciones favorables (Howard y Albregts, 1984 b).

Los estudios realizados por Wilson y colaboradores (1990), nos indican que el rango de temperaturas en el que se producen síntomas cuando se infectan frutos de fresa se encuentra entre los 6 y 30°C, incrementándose la incidencia de la enfermedad al aumentar la temperatura y el número de horas que se mantienen las condiciones de alta humedad relativa. A 35°C no se observan síntomas sobre frutos verdes y si en el caso de los maduros, pero con una incidencia de la enfermedad que disminuye al aumentar las horas de alta humedad.

Yang y colaboradores (1990 a) estudian, mediante un simulador, la infección de frutos que resulta de la dispersión de conidias de *C. acutatum* por la lluvia, encontrando que esta influenciada por los siguientes factores: intensidad y duración de las lluvias, distancia de la fuente de inóculo, tipo de cobertura en el suelo y dirección del viento. Al aumentar la distancia a la fuente de inóculo disminuye la incidencia de la enfermedad excepto en el caso de que la cobertura sea plástica. En un artículo posterior, analizan la influencia de la densidad de plantación, demostrando que existe una relación directa entre estos factores y la incidencia de la enfermedad (Yang et al., 1990 b). Boudreau y Madden (1995) llegaron a la misma conclusión, estudiando el efecto de la densidad de plantación en la dispersión de las conidias en invernadero mediante un simulador de lluvia.

El desarrollo de la enfermedad en estolones y peciolos se ve acelerado a temperaturas entre 25 y 30°C, a temperaturas inferiores (15 - 20°C) se retrasa la aparición y gravedad de los síntomas. Cuando tras la infección se mantiene un 100% de humedad relativa durante 48 horas, se intensifica la incidencia de la enfermedad (Delp y Milholland, 1980 b).

Las experiencias realizadas en ambiente controlado por Horn y Carver (1968) demuestran que al aumentar la duración de períodos a temperaturas bajas (5°C), disminuye el número de plantas muertas por podredumbre de corona cuando se trasplantan a invernadero a temperaturas de 28 - 32°C. Para Howard y Albregts (1984 b) temperaturas entre 4 - 10°C hacen que el hongo sobreviva en las coronas infectadas durante un largo período de tiempo sin matar a las plantas.

Smith y Black (1987) concluyen que las condiciones experimentales que



favorecen el desarrollo de la enfermedad son temperaturas de 30 a 35°C con 100% de HR durante 48 horas después del inicio de la infección, manteniéndose posteriormente a 32°C en condiciones de invernadero, observándose síntomas de podredumbre de corona a los treinta días.

En cuanto al efecto de los nutrientes sobre el desarrollo de la enfermedad, Smith (1987) señala que el incremento de los niveles de nitrógeno provoca mayor incidencia en su fase de podredumbre de corona, no influyendo las variaciones de los niveles de potasio o fósforo.

2.2.4.- CICLO DE LA ENFERMEDAD

2.2.4.1.- Expresión de los síntomas

Los campos de producción de frutos de fresa se establecen mediante la utilización de plantas procedentes de viveros, obtenidas por estolonamiento a partir de planta madre. El desarrollo de ACR en campo está, según Carver y Horn (1960), estrechamente relacionado con el hecho de que el stock de plantas se encuentre contaminado; de manera que en los campos de producción sólo morirían por esta enfermedad aquellas plantas de fresa que previamente estaban infectadas. En viveros, las plantas libres del patógeno no presentan síntomas; pero una vez que el hongo se introduce (Junio - Octubre) el desarrollo de la enfermedad es rápido, no existiendo evidencia de que esto ocurra en campos de producción (Noviembre - Mayo) (McInnes et al., 1992).

Howard y Albregts (1984 b) observaron que las plantas procedentes de viveros libres de la enfermedad no la desarrollaban en campos de producción cuando eran plantadas cerca de otras infectadas, incluso en el caso de altos porcentajes de muerte en las plantas enfermas.

La podredumbre de corona es difícil de detectar en las partidas de plantas que proceden de viveros, incluso en cortes de corona. La infección suele estar en un estado inicial, antes de que se desarrolle en los tejidos internos la típica coloración rojiza. El

patógeno continúa invadiendo los tejidos de la corona y la planta muere durante el invierno o primavera. El instante de la muerte depende del estado de la infección en el momento del trasplante, de la temperatura durante el periodo de producción de fruto, y probablemente de otros factores (Howard y Albregts, 1984 b) (Figura 1). Esta sintomatología ocurre algunas veces después de fuertes ataques al fruto. Las plantas no comienzan a decaer y morir hasta Abril, cuando se produce un aumento de las temperaturas, cerca ya del fin del período de producción, aún en el caso de que la podredumbre de frutos sucediera al inicio de la campaña (Howard et al., 1992). Como recogen Horn y Carver (1963), esto puede ocurrir a final de primavera y con temperaturas que cercanas a los 28°C, incluso sin la existencia previa de podredumbres de fruto.

Las plantas en fructificación parecen ser más resistentes que aquellas que están estolonando, incluso cuando los frutos son muy susceptibles. Debido a que se producen un gran número de esporas en los frutos afectados, se esperarían infecciones en peciolo y podredumbre de corona en un alto porcentaje, pero en las condiciones de Florida esto no sucede (Howard et al., 1992).

La mancha negra de la hoja ocurre en viveros y no se ha encontrado en campos de producción; cuando plantas sintomáticas son trasplantadas a estos campos, las hojas afectadas se secan y mueren, originándose nuevas hojas que permanecen sanas. Aparentemente la mancha negra de la hoja no es la fuente de inóculo inicial para el desarrollo de la enfermedad en flores o frutos.

La mancha irregular de la hoja ocurre cuando siendo jóvenes son infectadas en vivero por *Colletotrichum acutatum*. La lesión persiste después de que las plantas se hayan llevado a los campos de producción, y la primera hoja que aparece tras el trasplante suele estar infectada. El desarrollo de la lesión puede verse frenado, pero es observable sobre la hoja durante dos o tres meses. La esporulación que se produce se podría considerar la fuente de inóculo para las primeras infecciones de flores y frutos. Este síntoma no está presente en plantas procedentes de viveros libres de la enfermedad (Howard et al., 1992).

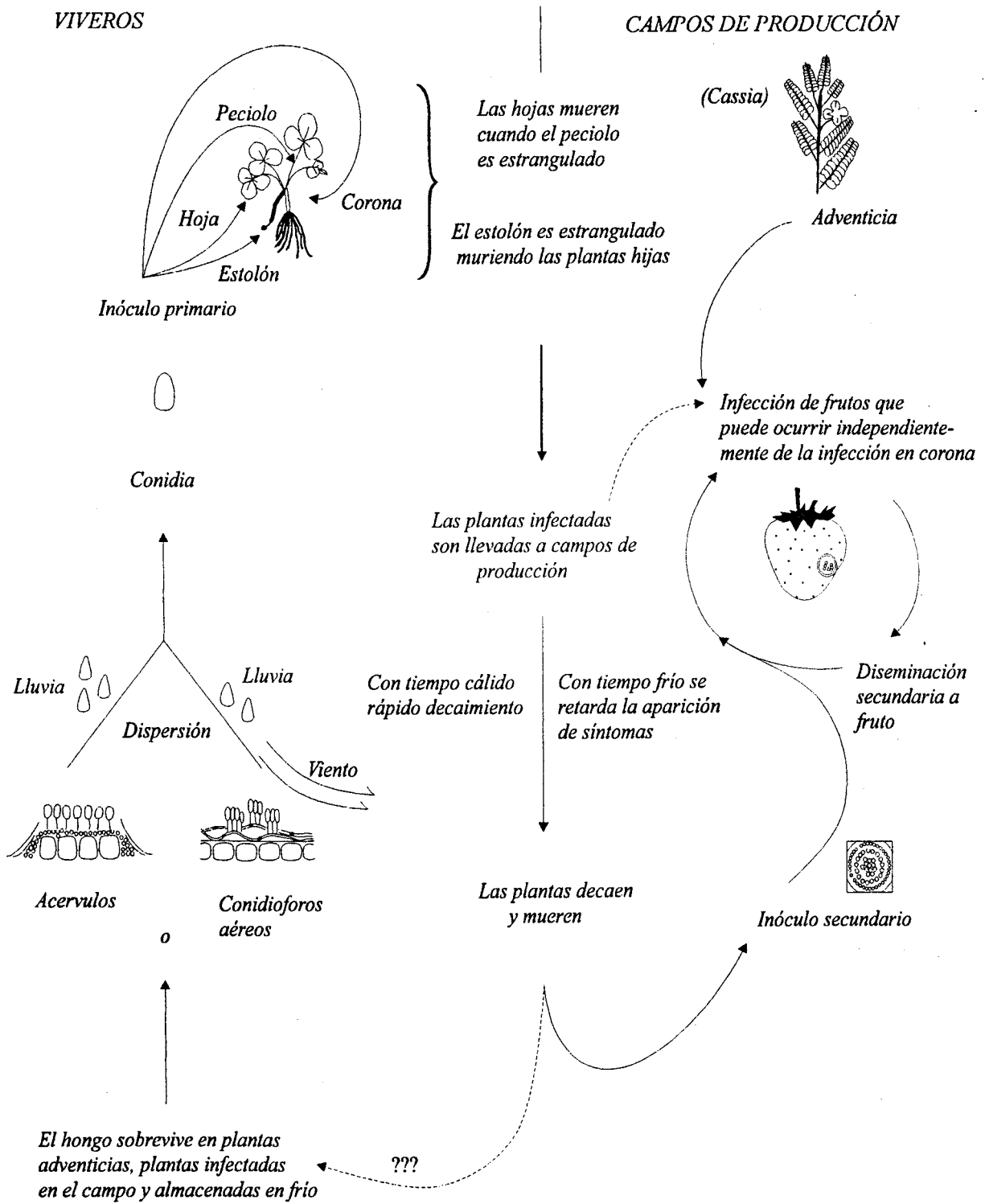


FIGURA 1.- Ciclo de la antracnosis en fresa originado por *Colletotrichum fragariae*.
(Propuesto por Howard y Albregts, 1984 b)

La podredumbre de frutos y la marchitez de las flores se pueden producir en cualquier momento durante el período productivo. Los botones florales, las flores y los frutos verdes de algunos cultivares de fresa son muy susceptibles a *Colletotrichum* spp.; en estos casos, cuando en el momento del trasplante se presentan síntomas de mancha irregular de las hojas, tal y como se indicaba anteriormente, las conidias presentes son diseminadas por el viento y el agua, provocando las primeras infecciones en botones florales, las cuales actúan como inóculo secundario, extendiéndose rápidamente la enfermedad, haciendo imposible cualquier intento de control.

En el caso de que las flores y los frutos verdes sean moderadamente resistentes, incluso aunque este presente la mancha irregular de las hojas, aún en cultivares susceptibles; la marchitez de las flores y la podredumbre de frutos maduros, no suelen ser un grave problema. Sólo tendrá una incidencia importante en el caso de una excesiva acumulación en campo de frutos muy maduros. Normalmente estos síntomas aparecen a mediados o final de la campaña de producción. El inóculo inicial debe de provenir de huéspedes locales distintos de la fresa, siendo muy favorables para el establecimiento y posterior desarrollo de la enfermedad períodos de lluvia de tres o cuatro días.

Por otra parte, el hecho de alta incidencia de ACR no tiene porque indicar que surjan posteriormente síntomas en frutos o flores; probablemente debido a que el patógeno no puede crecer desde los tejidos internos hacia la parte aérea.

La podredumbre de yema se desarrolla desde lesiones en los peciolo, comenzando a pudrirse a los dos o tres días del trasplante en los campos de producción. A menudo las plantas afectadas producen varias coronas nuevas, muriendo sólo la yema infectada originalmente. Ocasionalmente, decae y muere la planta completa, lo que puede ocurrir en cualquier momento durante la campaña de producción (Howard et al., 1992).

2.2.4.2.- Posibles fuentes de inóculo

Una vez descrito en que momento y como suceden las distintas fases de la enfermedad habría que preguntarse cuál es la fuente primaria de inóculo y como se

produce la diseminación.

En principio, Horn y Carver (1963) observaron que en determinadas zonas de cultivo la incidencia de ACR se incrementa año tras año bajo condiciones favorables, por lo que concluyeron que el hongo sobrevive en el suelo y desde allí infecta los tejidos de la corona, aunque señalan que existe la posibilidad de que se mantenga en el huésped. Años más tarde rectifican e indican que plantas sanas crecidas en suelos que previamente contenían plantas infectadas con *C. fragariae* no desarrollan la enfermedad, concluyendo que este patógeno no puede sobrevivir en el suelo (Horn y Carver, 1968).

Los trabajos arriba citados se enfocaron al estudio de *C. fragariae*, pero sus conclusiones se extrapolaron, durante mucho tiempo a todas las especies que originaban antracnosis en fresa, no observándose la posibilidad de que alguna de las otras especies presentara alguna fase de su ciclo en suelo (Eastburn y Gubler, 1990).

Existen estudios sobre la persistencia en suelo de especies de *Colletotrichum* que originan enfermedades sobre otros cultivos. Así Nair y colaboradores (1983), estudiaron la viabilidad en suelo de las conidias de *C. acutatum* f. sp. *pineae*, que origina antracnosis en *Pinus radiata*, observando que su número se reduce a la mitad en cuatro semanas; mientras que si se inoculan artificialmente restos de pino y se entierran, las conidias pueden sobrevivir en suelo hasta dos años.

Blakeman y Hornby (1966), analizaron la persistencia en suelo de *C. coccodes*, agente causal de antracnosis en tomate. Afirmaron que los esclerocios de este hongo son capaces de infectar plantas sanas tras 84 semanas en suelo. A conclusiones similares llega Farley (1976), cuando estudia en suelos artificialmente infestados la supervivencia de conidias y esclerocios de este mismo patógeno, aunque observa que la población de conidias se reduce en un 96 - 98% después de 52 semanas y no indica si tienen o no capacidad de infectar plantas sanas.

Eastburn y Gubler (1990), aislaron *C. acutatum*, con capacidad patogénica, de suelos de campos de fresa abandonados, en California. Demostraron que en invernadero se puede desarrollar la enfermedad en plantas sanas si el suelo está

infestado, y que el hongo puede sobrevivir sobre restos de tejidos de fresa, aunque la densidad de población en suelo disminuya gradualmente en un periodo de 11 meses. Sugieren que propágulos de suelo pueden ser un fuente de inóculo en viveros. En 1992, estos autores indicaron que al aumentar la temperatura y humedad en el suelo disminuye la supervivencia de las conidias en el mismo.

Es probable que en el clima más cálido y húmedo de Florida, *C. acutatum* no sobreviva en suelo o en restos de plantas enterrados durante largos periodos de tiempo. En esta zona, es frecuente que aunque durante una campaña se produzcan grandes pérdidas por antracnosis, al siguiente la enfermedad no se presente; lo cual lleva a pensar que ninguno de los patógenos puede sobrevivir en suelo (Howard et al., 1992).

Distintos autores consideran la posibilidad de que el inóculo primario se encuentre en plantas que sirvan como huésped intermediario. Howard y Albregts (1973) consideran probable que *Cassia obtusifolia* L., planta adventicia, actúe como tal. Aíslan de zonas sintomáticas de estas plantas *C. fragariae*, que resulta patógeno de fresa y que puede sobrevivir de un verano a otro sobre esta adventicia.

Utilizando *C. fragariae* como fuente de inóculo se realizan inoculaciones artificiales, sobre otras adventicias como *Duchesnea indica* (Andr.) Focke (Brooks, 1931) o *Potentilla canadensis* L. (Delp y Milholland, 1981), observándose que resultan infectadas.

Gullino y colaboradores (1985), indican que *Anemone coronaria* L. es severamente atacada por *Colletotrichum* sp., en el norte de Italia. Tras inocular artificialmente plantas de dicha especie con *C. gloeosporioides*, obtenido de lesiones en frutos de fresa, observan la aparición de síntomas caracterizados por curvaturas de las hojas. Al inocular frutos de fresa con *Colletotrichum* sp. de anémona, se reproducen los síntomas propios de antracnosis.

Raid y Pennypacker (1987), estudiaron 18 especies de adventicias como posibles huéspedes de *C. coccodes*, agente causal de antracnosis en tomate, observando la aparición de síntomas caracterizados por senescencia prematura y defoliación en diez de ellas.

Existe la probabilidad de que el inóculo primario provenga de otros cultivos. Como indican Maas y Howard (1985) muchos de los hongos que originan antracnosis en tomate, pepino, berenjena, sandía y otros, están muy relacionados con los patógenos de fresa y pueden infectar frutos bajo condiciones experimentales, pero no en campo.

Otros autores se inclinan a pensar que la fuente de inóculo se encuentra en la propia planta de fresa. Podría provenir de plantas con coronas infectadas, que por las condiciones ambientales no desarrollan la enfermedad y que se mantienen de un año a otro en el campo (Horn y Carver, 1968) o de frutos afectados si los viveros están cerca de los campos de producción (Howard, 1972). McInnes y colaboradores (1992) sugieren que la única fuente de inóculo de ACR son las plantas de fresa infectadas.

Para Wilson y colaboradores (1992), es posible que *C. acutatum* permanezca durante un período de al menos tres años en restos de frutos infectados mantenidos sobre o bajo el suelo y que desde allí se produzcan las posteriores infecciones.

2.2.4.3.- Diseminación de la enfermedad

No se han encontrado referencias escritas a la existencia de vectores que transmitan la enfermedad en el caso de la fresa, aunque si en otros cultivos. Así Nemeje y colaboradores (1990) estudian el potencial del parasitoide *Heterospilus prosopidis* (Hymenoptera: Braconidae) como vector de *Colletotrichum coffeanum* y *C. gloeosporioides*, agentes causales de antracnosis en café y mango respectivamente. De forma controlada se impregna el cuerpo del parasitoide con esporas de los patógenos analizando posteriormente su viabilidad y capacidad infectiva, que resultan positivas.

Parece ser que la rana verde (*Hyla cinerea*), habitual en los campos de arroz del Sudeste de Arkansas, es un vector efectivo en la dispersión de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschnomene*, agente causal de antracnosis en la adventicia *Aeschnomene virginica* (L.) B.S.P. (Yang et al., 1992).

Para Howard y colaboradores (1992), una vez que la parte aérea de una o pocas plantas se ve infectada, se producen, en las lesiones en desarrollo, una gran



cantidad de esporas que son dispersadas por el viento o el agua a otras plantas, extendiéndose el patógeno rápidamente bajo condiciones de altas temperaturas y humedad, que favorecen el progreso de la enfermedad.

En cuanto a la distancia a la que pueden ser diseminadas las conidias por el agua o el viento existen distintas opiniones. Para Denoyés-Rothan y colaboradores (1996) en una misma parcela no alcanzaría más de 50 m; según Delp y Milholland (1981), el hongo es capaz de infectar plantas sanas situadas a 450 m de la fuente de inóculo; para McInnes y colaboradores (1992), sólo sería capaz de recorrer 150 m.

Hay que indicar que la mayoría de la información conocida sobre el ciclo de ACR y de los factores que afectan al desarrollo de la enfermedad se refieren a *C. fragariae*; la enfermedad en campos de producción se asocia a plantas procedentes de viveros infectados. La diseminación del patógeno en plantas en fructificación es relativamente lenta, aunque las esporas transportadas por el viento o el agua infectan los frutos rápidamente. El hongo puede sobrevivir en coronas infectadas durante largos períodos sin matar a las plantas si las temperaturas son bajas (5 - 10°C), al aumentar la temperatura la planta muere rápidamente. El resto de los hongos asociados a ACR (*C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Glomerella cingulata* y *Gloeosporium* sp.), tienen un amplio rango de hospedadores y ciclos de enfermedad más sencillos. *C. acutatum* puede mantenerse en suelos durante al menos nueve meses en California y además puede ser transportado en material infectado (Gubler et al., 1988). *G. cingulata* y *C. gloeosporioides* parecen ser capaces, en zonas septentrionales, de sobrevivir de una campaña a otra en un amplio rango de huéspedes y como saprofitos (Maas y Galletta, 1989).

2.2.5.- ESTUDIOS SOBRE MEDIDAS DE CONTROL

A la vista del ciclo de la enfermedad y teniendo en cuenta como afectan los factores medio-ambientales, según Howard y Albrechts (1984 b) los métodos para prevenir la enfermedad habrían de comenzar en los viveros o al menos en el momento del trasplante. Las técnicas de lucha han de estar dirigidas a cada una de las fases de la enfermedad. Sería fundamental la elección de plantas sanas, certificadas, para evitar

en lo posible la existencia de focos de dispersión, limitando del número de ciclos de vida del hongo y su multiplicación mediante fungicidas y/o el uso de variedades resistentes (Denoyés-Rothan et al., 1996).

En general la ocurrencia de ACR y mancha irregular de las hojas en campos de producción podrían prevenirse controlando la enfermedad en viveros, mientras que las podredumbres de fruto y la marchitez de las flores son de difícil control. Howard y colaboradores (1992) aconsejan evitar la utilización, en campos de producción, de plantas con mancha irregular en las hojas, especialmente si se trata de cultivares muy susceptibles.

2.2.5.1.- Medidas profilácticas

En viveros, el seguimiento de las pautas aconsejadas por Howard y colaboradores (1984 b) podría facilitar la obtención de plantas sanas. Las medidas culturales propuestas son las siguientes:

- 1.- Situar los viveros en tierras con baja fertilidad residual.
- 2.- Una vez realizada la plantación, utilizar la mínima cantidad de abono necesaria para el establecimiento de las plantas.
- 3.- No aplicar fertilizantes durante los meses de Julio y Agosto.
- 4.- Aplicación de fungicidas desde la segunda quincena de Junio hasta Septiembre.
- 5.- En caso de aparición de algún signo de antracnosis, como mancha negra de las hojas, eliminar la fertilización con nitrógeno y potasio, y aplicar fungicidas después de cada periodo de lluvias o riego.
- 6.- Continuar con dos aplicaciones semanales de fungicidas desde la segunda quincena de Septiembre hasta el momento de la extracción de las plantas.

En el caso de utilización de cultivares resistentes se podrían aumentar la fertilización y disminuir las aplicaciones de fungicidas.

Conjuntamente con la utilización de material vegetal libre del patógeno es necesaria una buena práctica cultural en el caso de que la enfermedad llegue a manifestarse en los campos de producción. Es importante que las cosechas sean

frecuentes en tiempo cálido, ya que los patógenos se ven favorecidos con temperaturas superiores a 24°C. Todos los órganos que presenten síntomas deben ser eliminados, para así disminuir las fuentes de inóculo. Si existe podredumbre de frutos en ausencia de marchitez de las flores, el método más económico para evitar la diseminación de la enfermedad es la eliminación de todos los frutos maduros y que comiencen a madurar, aplicando posteriormente un fungicida adecuado. Para evitar la contaminación entre parcelas, los recolectores han de evitar trasladarse de un campo infectado a otro no infectado sin tomar las debidas precauciones higiénicas.

La contaminación de planta a planta se realiza principalmente por la proyección de gotas, debidas a precipitaciones o riegos por aspersión, y viéndose favorecido por la cobertura plástica. El riego por goteo y el cultivo abierto permiten reducir las infecciones (Denoyés-Rothan et al., 1996 y Howard et al., 1992).

Aunque parece ser que los hongos patógenos productores de antracnosis no se mantienen en el suelo o en residuos de plantas mas que por cortos períodos de tiempo (no superiores al año), la tendencia actual es recomendar esperar dos años entre cultivos, para evitar cualquier riesgo (Denoyés-Rothan et al., 1996).

2.2.5.2.- Control químico

Cuando Brooks (1931), describió la enfermedad en viveros, indicaba que aplicaciones de **cobre 20% PM**, en intervalos de diez días, durante los meses de verano frenan el progreso de la enfermedad cuando *C. fragariae* provoca estrangulamiento de estolones, pero sin facilitar un control completo. En 1935, el mismo autor, señala que en períodos de fuertes lluvias los tratamientos fungicidas no son efectivos, mientras que en condiciones de menor humedad **aceite de pino** conteniendo 15% de **resina de cobre** proporciona altos niveles de control.

En 1954, Sturgess señaló las dificultades en el control de podredumbre de frutos debido a los residuos y a la imposibilidad de mantener una cobertura de fungicida sobre el fruto, aconsejando el uso de medidas culturales.

Carver y Horn (1960), cuando se suponía que *C. fragariae* era un hongo de

suelo, realizan estudios de control de ACR, mediante fumigación de suelos; encontrando diferencias significativas entre el testigo no tratado y suelos a los que se había aplicado **bromuro de metilo**.

Howard (1971), señala la importancia del control de la antracnosis en viveros, para evitar pérdidas en los campos de producción. Mediante aplicaciones de fungicidas por pulverización, sobre plantas del cultivar "Tioga" (muy susceptible) naturalmente infestadas; realiza un primer ensayo de aplicaciones con periodicidad semanal, comenzando los tratamientos antes de que surjan los síntomas; y un segundo que se inicia cuando la mortandad de plantas es de un 50%, aplicándose los fungicidas dos veces por semana. Llega a la conclusión de que aplicaciones de **benomilo** (1-(butilcarbamoil) benzimidazol 2-il carbamato de metilo) más **pinolene** (di-1-p-metano), antitranspirante orgánico, facilita un control adecuado de ACR tras un mínimo de siete aplicaciones, incluso cuando se ha iniciado la enfermedad, reduciendo la mortandad de plantas a porcentajes de 25-50%. El resto de los fungicidas utilizados: **Captan** (N-(triclorometiltio) ciclohex 4-eno 1,2-dicarboximida), **zineb** (etilen bis ditiocarbamato de zinc), **zinc + maneb** (polimero del etilen 1,2-bis ditiocarbamato de manganeso) y **sulfato de cobre** fueron inefectivos, no incrementándose su capacidad fungicida al ser utilizados con **pinolene**. El **sulfato de cobre** se comporta como fitotóxico tras sucesivas aplicaciones.

Horn y colaboradores (1972) tras analizar "in vitro", mediante la técnica del medio envenenado, la eficacia de **benomilo**, **oxicarboxina** (4,4-dioxido de 5,6-dihidro 2-metil 1,4-oxatiin 3-carboxanilida) y **carboxina** (5,6-dihidro 2-metil 1,4-oxatiin 3-carboxanilida); determinan que **benomilo** reduce el crecimiento hifal de *C. fragariae* a concentraciones de 50 y 100 ppm, mientras que los dos últimos no son eficaces. En ensayos llevados a cabo en invernadero con plantas del cultivar "Dabreak", inoculadas artificialmente mediante inyección en corona y que posteriormente son tratadas por pulverización con los fungicidas citados a concentraciones de 1,2 gr/l se determina que **oxicarboxina** y **carboxina** no son eficaces y además resultan fitotóxicos, mientras que **benomilo** reduce al 7,5% la incidencia de ACR.

Delp y Milholland (1980 a) determinan la actuación "in vitro" de varios fungicidas sobre *C. fragariae* mediante la técnica de difusión en celofán de Neely y

Himelick (1966), para estudiar las actividades fungistáticas y fungicidas de los mismos. Las moléculas evaluadas fueron **captafol** (N-(1,1,2,2-tetracloroetil) ciclohexa 4-eno 1,2-dicarboximida), **captan**, **clortalonil** (tetracloro isoftalonitrilo), **maneb**, **benomilo** y **triforina** (N,N'-(piperazin1,4-diilbis ((triclorometil) metileno)) diformamida); a concentraciones de 0,04; 0,2; 1,0; 5,0; 20; 100 y 200 $\mu\text{g m.a./ml}$. Las concentraciones de fungicidas con capacidad fungotóxica varían según el aislado utilizado en todos los casos, excepto cuando fuera totalmente efectivo a la concentración más baja o inefectivo a la más alta, en cuyo caso funcionan de igual manera frente a todos los aislados. **Captafol** fue fungistático y fungicida a las concentraciones más bajas (0,04 y 1,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). **Captan** fue menos efectivo, ya que presentó actividad fungistática a concentraciones de 0,2-1,0 $\mu\text{g/ml}$ y fungicida a 20-100 $\mu\text{g/ml}$. **Maneb** y **benomilo** fueron fungotóxicos a 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$. **Clortalonil** presentó actividad fungistática a 1,0-5,0 $\mu\text{g/ml}$, pero no actuó como fungicida. **Triforina** fue totalmente inefectivo.

Las pruebas de campo para control de ACR en viveros, fueron llevadas a cabo con los mismos fungicidas y utilizando plantas del cultivar "Surecrop" procedentes de viveros libres de la enfermedad. Inoculando artificialmente, por pulverización con suspensión de conidias, las plantas de borde; de manera que la enfermedad se propagara por si misma. A las dosis aplicadas ninguno de los fungicidas resulto fitotóxico. **Captafol** controló la enfermedad en aplicaciones por pulverización a 1,2; 2,4; 3,6 y 4,8 g m.a./l, cuando se realizan las aplicaciones con periodicidad de siete días, siendo inefectivo con aplicaciones cada catorce días. **Benomilo**, **maneb** y **captan** no proporcionaron control de la enfermedad.

En Italia, Gullino y colaboradores (1985), analizan "in vitro" la efectividad de diferentes moléculas fungicidas en el control de *C. gloeosporioides*, agente causal de podredumbre negra del fruto, utilizando el método del medio envenenado. Los parámetros estudiados fueron crecimiento radial de la colonia y porcentaje de germinación de las conidias. Entre todos los fungicidas testados **procloraz** (N-propil N-(2,4,6-triclorofenoxi) etil) carbamoilimidazol) resulta el más efectivo, mostrando una fuerte inhibición tanto del desarrollo miceliar como del de colonias con DE_{50} (dosis efectiva al 50%) menor de 0,1 ppm y a 0,2 ppm respectivamente; siendo la CMI (concentración mínima inhibitoria) en el primer caso de 3 ppm y en el segundo

de 0,3 ppm. **Captafol**, **clortalonil**, **diclofluanida** (N-diclorofluorometiltio N',N'-dimetil N-fenilsulfamida), **tiram** (TMTD, disulfuro de bis (N,N-dimetiltiocarbamoilo)) y **metil-tolclofos** (tolclofos metil, O-2, 6-dicloro O,O-dimetil fosforotioato) mostraron buena actividad aunque las CMI del crecimiento micelar fueron superiores a 100 ppm. **Benomilo** resultó inefectivo (baja CMI, 1.000 ppm frente al crecimiento micelar y superior a 100 ppm frente a la formación de colonias), presentando una baja DE_{50} (0,3 ppm) contra el crecimiento micelar que no puede ser explicada. **Iprodiona** (glicofeno, 1-isopropilcarbamoil 3-(3,5-diclorofenil) hidantoína) y **vinclozolina** ((R,S) 3-(3,5-diclorofenil) 5-metil 5-vinil 1,3-oxazolidina 2,4-diona) también fueron totalmente inefectivos.

Gubler y colaboradores (1988), estudiaron la actividad de varios fungicidas en el control de ACR; utilizando para los ensayos plantas del cultivar "Pájaro", previamente inoculadas por inmersión en suspensión de conidias ($1,5 \times 10^6$ conidias/ml) de *C. acutatum*. Las plantas se mantuvieron en cámara frigorífica (3°C), durante una semana. Previo a la plantación se realizaron tratamientos mediante inmersión en solución de fungicida. Las materias activas utilizadas fueron **benomilo**, **clortalonil**, **captan**, así como **hipoclorito sódico**. La mayoría de los tratamientos no resultaron efectivos y sólo **benomilo** (1,2 g/l) dio un buen control comparado con el resto.

Los mismos tratamientos fueron testados sobre material vegetal naturalmente infestado, lo cual se comprobó mediante homogeneización de una muestra de plantas en agar agua (0,1%) en un agitador. Alicuotas de esta preparación se extendieron sobre la superficie de placas Petri, que contenían DPYA (agar dextrosa peptona con extracto de levadura), incubándose a 24°C durante seis días. Los tratamientos fungicidas no solo fueron inefectivos, sino que incluso mostraron niveles de enfermedad superiores a los presentes en las plantas infectadas y no tratadas. **Benomilo** fue efectivo en la eliminación de *C. acutatum* de la superficie de la planta, pero no cuando el organismo está presente en el interior de los tejidos de la corona.

Para determinar el efecto de la fumigación de suelos sobre propágulos de *C. acutatum* y en la supervivencia del mismo sobre restos de plantas enterradas, se realizaron aplicaciones con **bromuro de metilo** (67%) + **cloropicrina** (33%) a razón

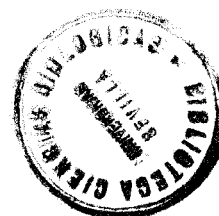
de 392 kg/Ha., sobre suelos artificialmente infestados mediante enterramiento de tejidos infectados. No se recuperó el hongo de los suelos tratados ni de los tejidos enterrados en las parcelas fumigadas.

Smith y Black (1991), estudian la eficacia de **benomilo**, **captafol** y **propiconazol** para el control de ACR en invernadero. Durante diez semanas y con intervalos de siete días se realizaron aplicaciones de fungicida por pulverización. Tras la cuarta, se inocularon las plantas mediante pulverización con suspensión de conidias de *C. fragariae*. A los treinta días se evaluaron los resultados, mediante una escala de severidad de 0 (plantas sin lesiones visibles) a 6 (plantas muertas). No hubo diferencias significativas entre cultivares ("Apollo", "Rossanne", "Sequoia" y "Titan"), por lo que se trataron como replicas en los análisis estadísticos. Las plantas tratadas con **propiconazol** presentaron un índice de severidad significativamente menor (1,3) que las tratadas con **captafol** (2,1) o **benomilo** (2,3). El tratamiento con **propiconazol** resultó fitotóxico, provocando crecimiento anormal en las plantas, caracterizado por escaso desarrollo y hojas gruesas de color verde oscuro.

McInnes y colaboradores (1992), llegaron a la conclusión de que no existía ningún fungicida registrado para su uso en fresa que fuera efectivo contra ACR. Se observó que **benomilo**, en los últimos diez o doce años, había perdido efectividad en aplicaciones por pulverización; lo cual podría ser debido a la existencia de razas de *C. fragariae* **benomilo-resistentes** (Smith, 1991).

En el caso de la fresa no existen estudios de utilización de fungicidas en post-cosecha para el control de antracnosis en fruto. Jeffries y colaboradores (1990), señalan que estos tipos de tratamientos son esenciales en el caso de algunos cultivos tropicales. La inmersión de los frutos en tanques de agua caliente, que contenga o no fungicidas, es muy utilizado, sobre todo en mango. Las investigaciones van encaminadas a seleccionar una temperatura lo suficientemente alta para la destrucción del patógeno, pero que no provoque daños al fruto. Algunos de los fungicidas utilizados, que han dado buenos resultados han sido: **benomilo**, **procloraz**, **metiltiofanato** y **propiconazol**.

En 1996, Denoyés-Rothan y colaboradores indicaron que la gama de productos



utilizables contra la antracnosis en fresa está muy limitada (Tabla 1), debido por una parte a que son pocos los productos homologados (**maneb** y **metil-tiofanato**) y de otra a que la estrategia de tratamiento con ellos sería sólo preventiva y deben aplicarse con la aparición de los primeros frutos verdes. Las aplicaciones deben restringirse teniendo en cuenta la existencia de condiciones favorables al desarrollo de la enfermedad (temperaturas de 20-25°C y alta humedad), sobre todo los ocho o diez días siguientes a lluvias superiores a 25 mm. Por otra parte hay que tener en cuenta la normativa de tolerancia de residuos en fruto, por lo que una vez que han comenzado las recolecciones los tratamientos deben evitarse. Según dicha autora podrían utilizarse fungicidas anti-botríticos como **diclofluanida** o de inhibidores de biosíntesis de esteroides efectivos contra "oidio", que presentan una eficacia parcial en la lucha contra antracnosis.

FUNGICIDA	LMR (mg/Kg)	FUNGICIDA	LMR (mg/kg)	FUNGICIDA	LMR (mg/kg)
BENALAXIL	0,05	FENARIMOL	1,00	PIRIFENOX	0,20
CARBARIL	1,00	FLUSILAZOL	0,01	PROCIMIDONA	5,00
CARBENDAZIMA	5,00	FOSETIL-AL	0,50	PROPAMOCARB	0,50
CIPROCONAZOL	0,01	HEXACONAZOL	0,10	PROPICONAZOL	0,05
CLORANFENICOL	0,00	IMAZALIL	0,02	TEBUCONAZOL	0,05
CLORTALONIL	1,00	IPRODIONA	10,0	TETRACONAZOL	0,01
DICLOBUTRAZOL	0,05	LINDANO	1,00	TIABENDAZOL	3,00
DICLOFLUANIDA	0,30	METALAXIL	0,50	TIRAM	3,80
DICLORAN	5,00	MICLOBUTANILO	2,00	TRIADIMEFON	0,20
DIETOFENCARB	0,50	NITROTAL	0,05	TRIFLUMIZOL	0,20
DINICONAZOL	0,05	NUARIMOL	0,01	TRIFORINA	0,01
DITIOCARBAMATO	2,00	OFURACE	0,05	VINCLOZOLINA	5,00
ETIRIMOL	0,05	OXADIXIL	0,20		
ETRIDIAZOL	0,10	PENCONAZOL	0,20		

TABLA 1.- Límites máximos de residuos autorizados en frutos de fresa.
(BOE, 56 - 27 de Febrero de 1996)

2.2.5.3.- Utilización de cultivares resistentes

Debido a las dificultades existentes en la utilización de fungicidas efectivos en el control de antracnosis en fresa, la tendencia actual es la búsqueda de cultivares resistentes (Denoyés- Rothan y Baudry, 1995). La situación de la antracnosis varía de una situación geográfica a otra debido a la existencia de distintos patotipos del agente causal. En Florida (EEUU), en los programas de mejora llevados a cabo se han encontrado altos niveles de resistencia a los patógenos allí presentes. El cultivar "Dover" resultó resistente a ACR y a podredumbre de frutos, pero cuando se planta en Carolina del Sur, un alto número de plantas mueren debido a la existencia de otras razas de *Colletotrichum* (Chandler, 1991).

Los síntomas de antracnosis en fresa aparecen en peciolos, estolones, corona, hojas, flores y frutos. La susceptibilidad de los cultivares varía según sea la zona afectada (Tabla 2). La genética de la resistencia a los patógenos que causan la enfermedad es complicada; algunas observaciones realizadas en Florida (EEUU) indican que clones de fresa resistentes a uno de los tres patógenos existentes en la zona (*C. fragariae*, *C. acutatum* y *Glomerella cingulata*) son también resistentes a los otros dos. Si un clon no es susceptible a la infección de estolones o coronas, tampoco lo es a las otras manifestaciones de la enfermedad. No se conoce ningún cultivar que sea resistente a todas las formas o razas de estos patógenos. De otra parte, un cultivar que sea resistente al patógeno predominante en una zona puede ser susceptible a los presentes en otras. Los programas de mejora intentan desarrollar cultivares con altos niveles de resistencia bajo condiciones favorables al desarrollo de la antracnosis, pretendiendo reconocer los componentes patogénicos de la enfermedad que se modifican de una zona de cultivo a otra (Maas y Galletta, 1989 y Howard et al., 1992).

La primera referencia a programas de mejora encaminados a la búsqueda de resistencia a *C. fragariae*, agente causal de ACR, data de 1972. Horn y colaboradores, utilizando material vegetal autóctono y algunos cultivares comerciales, estudiaron la resistencia de las progenies F₁ y S₁, que fueron inoculadas artificialmente, realizando posteriormente el conteo de plantas muertas. Las más resistentes fueron aquellas que tuvieron como progenitor a uno de estos clones: La 6-632, La 6-995 o La 5-2556.

CULTIVAR	ESTOLÓN Y PECIOLO	MARCHITEZ DE LA FLOR	POD. FRUTO VERDE	POD. FRUTO MADURO	POD. DE CORONA	MANCHA NEGRA HOJA	MANCHA IRR. HOJA
PÁJARO	VS ^a	VS	VS	VS	VS	VS	VS
IRVINE	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS
SELVA	VS	MS	MS	VS	VS	VS	VS
TUFTS	VS	S	S	VS	VS	VS	VS
CHANDLER	VS	S	S	VS	VS	VS	VS
TIOGA	VS	S	S	VS	VS	VS	VS
FRESNO	VS	S	VS	VS	VS	VS	VS
SEQUOIA	S	R	R	MS	MS	... ^b	...
FLORIDA	MR	VR	VR	MR	MR
F. BELLE	R	VR	VR	MR	MR
DOVER	VR	VR	VR	MR	VR	VR	VR

TABLA 2 .- Susceptibilidad de cultivares de fresa a distintas fases de la antracnosis en Florida^c (Howard et al., 1992).

^a VS = muy susceptible, MS = moderadamente susceptible, S = susceptible, R = resistente, MR = moderadamente resistente y VR = muy resistente. ^b Sin dato. ^c En Florida, *C. fragariae* y *G. cingulata* originan todas las fases de la enfermedad excepto mancha irregular de las hojas y podredumbre de yema, y *C. acutatum* todas excepto la podredumbre de corona y la mancha negra de la hoja.

En 1972, Figueredo y colaboradores analizan la respuesta a *C. fragariae* de 23 cultivares e híbridos, considerando resistentes aquellos grupos en los que la mortandad no superaba el 30%; varios híbridos no comerciales resultaron resistentes, pero sólo un cultivar "Monte Alegre". De los 85 clones (cultivares y selecciones) evaluados para resistencia a *C. acutatum* por Faedi y colaboradores (1991), resultaron resistentes los siguientes: "Honeoye", "Primella", "Sequoia", "Idea", "Rapella", "Savio", "Athena", "Etna", "Chandler", "Senga Fructarina", "Pandora", "Belrubi", "Douglas", "Ferrara" y "Elvira".

Un gran número de autores estudian como evaluar la resistencia de plantas de fresa a los agentes causales de antracnosis. Delp y Milholland (1980 b), describen una técnica de inoculación y evaluación para resistencia a *C. fragariae*. Estudiando la susceptibilidad de los tejidos, edad y densidad del inóculo, así como las condiciones

medioambientales necesarias para el desarrollo de la enfermedad. Una de las técnicas utilizadas fue la inyección en corona de suspensión de conidias, la cual provocó la muerte del 95% de las plantas, ya que con este método se sobrepasaban los mecanismos de resistencia. La técnica que se aconseja para determinar la resistencia consta de las siguientes fases: inoculación de peciolo por pulverización con suspensión de conidias (10^6 conidias/ml), incubando posteriormente la plantas a 100% HR y 28°C durante 48 h., manteniéndolas posteriormente a 25°C. El índice de enfermedad se consideró en base a la reacción de los peciolo, entendiendo que la planta es susceptible cuando el peciolo es estrangulado. La edad del inóculo no afecta a la cantidad de infección, a 30°C todos los cultivares son susceptibles, lo que también ocurre sí el tiempo en cámara húmeda supera las 72 h. En 1981, los autores anteriormente citados evaluaron la susceptibilidad de varios cultivares de fresa siguiendo dicha técnica (Tabla 3). De igual forma resultan resistentes y con índices de enfermedad de 1,1 los clones La 6-632 y La 2-556.

Smith y Spiers (1982), desarrollaron una metodología para la evaluación de gran número de plantas en un corto espacio de tiempo, lo cual era necesario para llevar a cabo un amplio programa para la obtención de cultivares resistentes a *C. fragariae*. Descartan aquellos métodos de inoculación que precisan realizar heridas en la planta, ya que resultan en un 100% de susceptibilidad; el método más práctico es la pulverización del inóculo (9×10^5 conidias/ml), manteniendo posteriormente las plantas en cámara húmeda (90 - 100% HR, 25 - 32°C con 16 h. luz) durante períodos de tiempo de 0 a 72 h. Se considera que la planta es susceptible si aparece una lesión roja o negra de al menos 1 mm de longitud sobre los peciolo inoculados.

En 1987, Smith y Black, observaron que la resistencia de plantas de fresa a *C. fragariae* se ve afectada por variaciones en las condiciones ambientales. Utilizan los cultivares "Sequoia" (resistente), "Cardinal" y "Tioga" (susceptible). La inoculación se realizó por pulverización, utilizando un rango de concentraciones de $1,5 \times 10^6$ a $6,0 \times 10^6$, que no resultan significativamente diferentes. Para determinar la severidad de la enfermedad utilizan la escala de Delp y Milholland (1980) modificada, para incluir una categoría que reconozca síntomas en corona en plantas vivas. Las clases propuestas fueron: 0 = plantas sanas sin lesiones visibles, 1 = plantas con lesiones en peciolo de 3 mm de longitud, 2 = plantas con lesiones en peciolo de 3

CULTIVAR	INDICE DE ENFERMEDAD ^a	TIPO DE RESPUESTA
DOVER	1,3	RESISTENTE
SEQUOIA	1,4	RESISTENTE
TENNESSE BEAUTY	2,1	INTERMEDIA
APOLLO	2,4	INTERMEDIA
TITAN	2,6	INTERMEDIA
FLORIDA 90	2,6	INTERMEDIA
EARLIBELLE	2,9	INTERMEDIA
SENTINEL	2,9	INTERMEDIA
ROSEANNE	2,9	INTERMEDIA
ALBRITTON	3,3	SUSCEPTIBLE
PRELUDE	3,3	SUSCEPTIBLE
EARLIGLOW	3,3	SUSCEPTIBLE
SUNRISE	3,4	SUSCEPTIBLE
ATLAS	3,6	SUSCEPTIBLE
SUMMER	3,6	SUSCEPTIBLE
DELIGHT	3,8	SUSCEPTIBLE

TABLA 3.- Respuesta de cultivares de fresa a la infección con *C. fragariae*
(Delp y Milholland, 1981).

^a 0 = sin infección, 1 = lesión en peciolo menor de 3 mm de longitud, 2 = lesión de 3 a 10 mm, 3 = lesiones de 10-20 mm, que estrangulan el peciolo, 4 = peciolo necrosado y 5 = corona necrótica, planta muerta.

a 10 mm de longitud, 3 = plantas con lesiones en peciolos mayores de 10 - 20 mm, normalmente estrangulándolo, 4 = plantas con lesiones en peciolos mayores de 20 mm o con el peciolo enteramente necrosado, 5 = plantas cuyas hojas más jóvenes aparecen decaídas, indicando infección en corona y 6 = planta muerta con corona necrosada. Se consideraron resistentes las plantas con un índice de 2 o inferior, de respuesta intermedia si estaba entre 2,1 y 3,9 y susceptibles si era superior a 4. Observaron que plantas incubadas a 35°C durante 48 h. en cámara húmeda presentaban índices de enfermedad más altos que las incubadas a 25 o 30°C. En el caso de "Sequoia" y "Cardinal" los índices se elevaron cuando las plantas se mantuvieron en invernadero

a 32°C, en vez de a 25°C.

Años más tarde, Smith y colaboradores (1990 a), analizan la influencia de la edad de las plantas, obtenidas de semilla, en el momento de la inoculación por pulverización. Determinan que plantas de dos a cuatro semanas son más susceptibles a *C. fragariae*, que aquellas inoculadas transcurridas catorce a dieciocho semanas después de la aparición de la primera hoja.

La respuesta de resistencia de distintos cultivares frente a *C. fragariae* y *C. acutatum*, es muy similar, aunque algunos son más susceptibles a determinados aislados de la segunda especie citada que a otros de la primera, lo que indica la necesidad de identificar el agente causal antes de iniciar cualquier programa de mejora. El cultivar "Sunrise" fue susceptible a algunos aislados de *C. acutatum* y resistente a uno de *C. fragariae* (Smith y Black, 1990 b).

Gupton y Smith (1991), inician los estudios sobre herencia genética de la resistencia a *C. fragariae* y *C. acutatum*. Confirman que *C. acutatum* provoca una reacción menos severa en las plantas, aunque la mayoría de los cultivares muestran una respuesta genética similar a ambas especies patógenas. En una primera experiencia analizan la varianza genética y ambiental en una pequeña población, utilizando clones de respuesta conocida. Posteriormente, partiendo de una población con una base genética más amplia, analizan la importancia de la varianza genética aditiva y dominante, y de las interacciones no alélicas en la herencia de la resistencia. El hecho de que la frecuencia de distribución de los rangos de severidad de la enfermedad sea bimodal, en ambos experimentos, sugiere una acción genética, existiendo la posibilidad de efectos epistáticos.

Se conoce muy poco respecto a las fuentes de resistencia a los patógenos (*C. fragariae*, *C. acutatum*, *C. dematium* y *C. gloeosporioides*) que originan podredumbres de fruto, aunque normalmente la respuesta de los cultivares inoculados mediante heridas es uniformemente susceptible; pero las observaciones de campo sugieren que algunos cultivares poseen niveles moderados de resistencia (Maas y Galletta, 1989).

La mayoría de la información obtenida se refiere básicamente a *C. fragariae*. Hay que indicar que la evaluación de las reacciones a la enfermedad es relativa, reflejando el comportamiento del cultivar en una zona determinada; encontrándose, en ocasiones, que un mismo cultivar muestra distintas respuestas (Tabla 4). Esto es un indicio de que existen uno o varios factores interactuando: diferentes razas del patógeno en distintas localizaciones, aspectos ambientales que varían de una zona a otra y que afectan a la relación huésped-patógeno y las diferencias en los métodos usados para determinar la reacción a la enfermedad (Maas y Galletta, 1989).

A pesar de todo ello, según Denoyés-Rothan y colaboradores (1996), la utilización de variedades resistentes constituye un método de lucha poco contaminante, siendo particularmente interesante en el caso de enfermedades policíclicas, ya que permite limitar el número de ciclos del hongo en activo. Se requiere, por parte de los mejoradores una profundización constante en las relaciones huésped - patógeno antes de abordar la selección de cultivares que posean resistencia duradera. Entre los cultivares remontantes, la resistencia a la marchitez de la planta que originan los ataques a corona es un criterio primordial a la hora de la multiplicación en viveros. Cuando el hongo se multiplica rápidamente en los frutos, los cultivares sensibles a ACR, como "Irvine", presentan una importante mortandad de las plantas durante el cultivo, aunque también algunos cultivares resistentes pueden presentar síntomas en fruto. En cultivares no remontantes como "Sequoia", la resistencia de la corona limita la multiplicación del hongo reduciendo la cantidad de inóculo primario.



CULTIVAR	REACCIÓN	CULTIVAR	REACCIÓN
ALBRITTON	S - R ^a	SENTINEL	S - I
APOLLO	I - R	SEQUOIA	S - R
BLAKEMORE	S - I	SILETZ	S - I
EARLIBELLE	S - I	SUMMER	S - R
FLORIDA BELLE	I - R	SUNRISE	S - I
FLORIDA NINETY	I - R	TENNESSE BEAUTY	VS - I
POCAHONTAS	S - I	TIOGA	VS - S
ROSANNE	S - R	TITAN	VS - I

TABLA 4.- Distintas respuestas de cultivares frente a *C. fragariae* (Maas y Galletta, 1989).

^a VS = muy susceptible; S = susceptible; I = intermedia y R = resistente.

2.2.5.4.- Otras medidas de control.

Los intentos de control de ACR mediante incorporación de resistencia han tenido un éxito limitado debido por una parte a las dificultades que entraña el obtener cultivares resistentes y aceptables desde el punto de vista agronómico, y por otra a la existencia de numerosas razas fisiológicas del patógeno. No existe ningún cultivar resistente que sea comercialmente aceptable y parece ser que tampoco hay fungicidas registrados para su uso en fresa que sean efectivos en el control de la enfermedad. Por ello McInnes y colaboradores (1992), pretendieron determinar si plantas obtenidas mediante cultivo de tejidos podían mantenerse libres de patógenos. Las plantas se produjeron en viveros alejados de las áreas de producción y al ser trasplantadas permanecieron sanas. Este resultado sugiere que la fuente de inóculo inductor de ACR son las propias plantas de fresa infectadas, por lo cual el uso de plantas libres del patógeno podría ser una buena medida de control.

Habitualmente, en viveros, se realizan tratamientos por inmersión en solución de fungicidas, pero debido a la tendencia actual de eliminación de los pesticidas y a la ineficacia de los tradicionales, se están re-evaluando las técnicas de tratamiento por inmersión en agua caliente en pre-plantación para el control de enfermedades.

Este tipo de terapia ha tenido éxito en algunos cultivos, pero las experiencias en fresa son limitadas. Según Buchner (1991), existe relación entre la temperatura y el tiempo de inmersión, de manera que a tiempos cortos y altas temperaturas se produce una mortalidad similar que la provocada por tratamientos a tiempos más largos y temperaturas más bajas. Temperaturas y tiempos de 48,8°C durante 5 min. y 49,4°C durante 7 min. son aceptables para obtener plantas de fresa de buena calidad, aunque esta última combinación podría producir daños en las mismas. Las observaciones sugieren que durante dos o tres semanas se puede ralentizar el crecimiento y observarse una reducción en el vigor de las plantas. Por estas razones no se aconseja este tipo de tratamiento para plantas destinadas a campos de producción de fruto.

En la obtención de plantas libres de patógenos que originan podredumbre de corona se han utilizado tratamientos por inmersión en agua caliente. Así, Miller y

Stoddard (1956), combinaron distintos tiempos y temperaturas en la búsqueda de aquella combinación que fuera letal para los patógenos e inócua para la planta. Los hongos testados "in vitro" fueron *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium* spp. y *Verticillium albo-atrum* Reinke y Bert.. Sólo *R. solani* fue eliminado a temperaturas y tiempo no dañinos para la planta (53°C durante 4 min.).

Gubler y colaboradores (1988), realizaron estudios que muestran que *C. acutatum* no es recuperado de los tejidos de corona de plantas de fresa naturalmente infectadas después de ser tratadas por inmersión en baño de agua caliente (49,4°C) durante 5 min., tratamiento que dio mejor resultado que cualquiera de los fungicidas utilizados, aunque en ensayos de campo no fue totalmente efectivo. Este tipo de tratamiento no provoca un aumento en la mortandad de las plantas ni disminuye significativamente la producción de planta hija.

La búsqueda de estrategias alternativas al uso de químicos para el control de enfermedades de las plantas es en la actualidad un reto encaminado a la utilización de métodos biológicos. Es necesaria una amplia información sobre la ecología microbiana, para explotar adecuadamente las interacciones entre la microflora saprofítica y los hongos que originan las enfermedades. Se han llevado a cabo algunos progresos en el control biológico en post-cosecha, aunque en el caso de *Colletotrichum* no existen aún aplicaciones prácticas, debido a que habría que determinar que fases del ciclo de vida del hongo son más o menos susceptibles a la inhibición por parte de los posibles antagonistas. Probablemente, una vez que el hongo ha penetrado en los tejidos de la planta es inmune a la acción de otros micro-organismos, por lo que sería interesante disminuir la cantidad inicial de inóculo presente. El control del establecimiento de la antracnosis podría conseguirse mediante el aumento de la microflora existente en la superficie de la planta, de forma que compitieran por espacio o nutrientes con el inóculo de *Colletotrichum* o bien inhibieran la germinación de las conidias. Los estudios realizados en laboratorio indican que la inhibición se debe generalmente a la acción de antibióticos o enzimas líticos (Jeffries y Koomen, 1992).

Koomen y Jeffries (1993), estudiaron el potencial inhibitorio de varios micro-organismos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos), aislados directamente de hojas y frutos de mango, sobre *C. gloeosporioides*, agente causal de antracnosis en

esta especie. "In vitro", determinan mediante enfrentamiento de las colonias la capacidad de inhibición de los distintos organismos según el porcentaje de reducción del crecimiento hifal. Utilizando aquellas bacterias que dieron mejores resultados, se inocularon frutos maduros de mango con los agentes inhibidores y el patógeno. *Bacillus cereus* y *Pseudomonas fluorescens* limitaron el desarrollo de la enfermedad.

Se han realizado estudios de biocontrol de *Colletotrichum truncatum*, agente causal de antracnosis en *Vigna unguiculata* L. Walp., utilizando como antagonista *Trichoderma viride*, aislado de esta planta. Mediante aplicaciones con suspensión de esporas e inoculación de suelos se redujo considerablemente la expresión de síntomas en semillas infectadas (Bankole y Adebajo, 1996).

2.3.- EL GÉNERO COLLETOTRICHUM

2.3.1.- CLASIFICACIÓN

Colletotrichum y su teleomorfo *Glomerella* están implicados en enfermedades de las plantas en todo el mundo. El concepto de especie se basa en la morfología del hongo en medio natural o en cultivo, a veces en combinación con la presencia de especificidad por un huésped o en la ausencia de la misma. A todo ello son debidos los numerosos problemas en la identificación (Sutton, 1992).

El nombre genérico de *Glomerella* fue introducido en 1903 por Schrenk y Spaulding con cinco especies originales. Se describió para acomodar los teleomorfos de *Gloeosporium* auct. y *Colletotrichum* Corda, los cuales estaban situados incorrectamente en *Gnomoniopsis* Berlese *sensu* Stoneman. *Glomerella* es un ascomiceto que pertenece a la familia Phyllachoraceae caracterizado por presentar un ascoma de color negro y paredes delgadas sin material estromático (Sutton, 1992).

El género *Colletotrichum* se encuadra en la división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina y clase Coleomycetes. Por tanto son hongos verdaderos, con pared celular, micelio septado, esporas asexuales o conidias, esporas sexuales ausentes y con conidias que se forman en acérvulos (Sutton, 1980).

Existe variedad de opiniones sobre cuales son los límites del género *Colletotrichum*, habiendo hasta 17 sinónimos del mismo, como *Vermicularia*, *Dicladium*, *Gloeosporium* y *Ellisiella* (Sutton, 1992).

2.3.2.- TAXONOMÍA ESPECIFICA

2.3.2.1.- *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds.

Según la descripción realizada por Simmonds (1965) sobre un cultivo crecido en patata dextrosa agar (PDA): Especie de crecimiento lento, con temperatura óptima de 25 a 26,8°C. Presenta micelio tenue e hialino, que con el tiempo se torna más oscuro. El margen de crecimiento es normalmente abrupto. Pueden estar presente clamidosporas en posición terminal o intercalar, que pueden ser hialinas, aunque normalmente son oscuras y surgen de las hifas más viejas. El color de la colonia es en principio blanco, para a los pocos días aparecer desde el centro una capa grisácea, por lo que el color final es gris o marrón grisáceo. Esa capa tiene una apariencia cristalina. El reverso de la colonia es blanco o crema, con algunas zonas rosadas, aunque en algunos aislados es de un color rosa brillante.

La producción de conidias es abundante, apareciendo distribuidas, en cultivo puro, por todo el micelio, aunque pueden surgir de masas de conidioforos que forman acérvulos. Sobre el huésped se producen en acérvulos. No se observan quetas en asociación con los acérvulos, pero aparecen escasamente desarrolladas, de forma ocasional, en cultivo. Los conidioforos tienen dos o tres veces la longitud de la espora y la mitad de su anchura. El tamaño medio de las conidias es de 8,3 - 14,4 x 2,5 - 4,0 μm ; variando en tamaño, siendo la mayoría cortas, estrechas, con extremos puntiagudos, aunque algunos aislados presentan numerosas esporas más grandes. El color de las esporas en masa tiende a rosa y con el tiempo a salmón.

Aunque para algunos autores la forma y color de los apresorios es un criterio para separar las especies de *Colletotrichum*, este autor no encuentra suficientes diferencias para que sea clarificador. Los define como escasos, de color marrón claro u oscuro, clavado o ligeramente irregular, cuyo tamaño se encuentra en los siguientes

márgenes: 8,5 - 10 x 4,5 - 6,0 μm . Este organismo se reconoce como especie tipo en 1968 (Simmonds, 1968).

Para Howard y Albrechts (1984 b), las conidias de *C. acutatum* son cilíndricas con un tamaño 12,9 - 13,9 x 3,2 - 3,9 μm . No presenta quetas, la colonia es gris o marrón grisáceo y forma clamidosporas.

2.3.2.2.- *Colletotrichum fragariae* Brooks.

Las colonias son de color oliva, gris oscuro o negras, raramente blancas o beige, con el reverso oliva oscuro o gris oscuro. Con hifas cortas, algodonosas y aéreas, apareciendo las conidias en masas rosadas. Presentan acérvulos dispersos, la mayoría lenticulares cuyo tamaño medio es de 110 x 40 μm . Las quetas surgen del acérvulo, siendo pocas o abundantes, apareciendo aisladas o en grupos, algunas sinuosas, septadas 1 o 2 veces, con un tamaño medio de 115 x 4,3 μm , marrón oscuras y sub-bulbosas en la base volviéndose más claras hacia el ápice, a veces con una ligera constricción en la célula apical. Las conidias son abundantes, con tamaños que oscilan entre 14 - 21 x 3,9 - 6,3 μm (media 16,4 x 4,8 μm), con forma de huso, extremos redondeados, granulares y que en masa aparecen rosas. Los conidioforos son hialinos, no septados, ovoides, con un tamaño de 5 - 10 x 3 - 5 μm (Sutton, 1992).

Se testó su patogenicidad sobre varias plantas: alfalfa, espinaca, malva, cabeza de dragón, trébol rojo y judía, no originando síntomas (Brooks, 1931).

Algunos autores consideran que *C. fragariae* se incluye dentro de las muy variables especies de *C. gloeosporioides* (Howard y Albrechts, 1983; Sturgess, 1954), mientras que para otros debe considerarse una especie separada (Smith y Black, 1990 b).

2.3.2.3.- *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz). Teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. and von Schrenk

Sutton (1992), recoge la descripción realizada por Penz. Las colonias presentan una coloración que varía desde el blanco grisáceo a gris oscuro, micelio

uniforme aéreo o elevado asociado con conidioma, el reverso de la colonia es blanco a gris o más oscuro con el tiempo. Puede presentar o no quetas. Los esclerocios están ausentes, pero se pueden confundir con ascomas inmaduros. Los apresorios son ovoides, obovoides, a veces lobulados, de color sepia, 6 - 20 x 4 - 12 μm . Las conidias en masa son de color salmón claro, rectas, cilíndricas, ápice obtuso, base truncada, 12 - 17 x 3,5 - 6 μm . La especie es muy heterogénea y especialmente en cultivo las características son muy variables.

Howard y Albrechts (1983), determinan que las diferencias entre *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* residen en que el primero forma peritecio en cultivo, presenta conidias blancas o translúcidas y menos abundantes siendo su tamaño ligeramente mayor (17,2 - 18 x 6,2 - 6,5 μm) que el de las conidias del segundo (16,4 x 4,8 μm).

García-Jiménez y colaboradores (1983), identifican como *C. gloeosporioides* un hongo aislado de fruto de fresa en España. Desarrolla acérvulos glabros con cirros de color naranja y conidias bacilariformes, algo afiladas en sus extremos y de medidas 13,2 - 17,9 x 3,8 - 5,0 μm . Los acérvulos no produjeron quetas.

2.3.2.4.- *Colletotrichum dematium* (Pers.: Fr.)

Beraha y Wright (1973), describen *C. dematium* aislado de fresa, como distinto de *C. fragariae* y con las siguientes características, cuando es crecido en agar harina de avena: Micelio expandido, acérvulos predominantes sobre tejido, cuyo diámetro varía de 250 a 440 μm . Temperatura óptima de crecimiento 25°C. Las conidias son estrechas, en forma de hoz y con los extremos puntiagudos, su color en masa es gris claro y su tamaño es de 24,3 x 3,0 μm . Las quetas son numerosas y su longitud varía de 230 a 260 μm .

La descripción que realiza Sutton (1962) es ligeramente distinta. Los acérvulos de 50 - 400 μm de diámetro, son negros, abundantes, circulares o longitudinalmente alargados, en principio cubiertos por la cutícula y la epidermis, para luego abrirse con un considerable desarrollo estromático, exudando masas de esporas de color gris humo y cubierto por un número abundante de quetas divergentes. Las quetas (60 - 200 x 4 -

7,5 μm) son abundantes, rectas, raramente curvadas pero ocasionalmente irregulares en el ápice. Presentan septos, de 0 a 7, normalmente 3 o 4. Las conidias se forman como un hinchamiento del ápice del conidioforo, y una vez que se libera la primera espora, se desarrollan en sucesión basípeta numerosas fialosporas, sin que exista un incremento de longitud de la fiálide. Las conidias (18 - 26 x 3 - 3,5 μm), son hialinas, unicelulares, fusiformes, de ápices agudos, base truncada y gutuladas irregularmente. Los apresorios son ovoides o irregulares, de color marrón, con los márgenes enteros o ligeramente lobulados y de tamaño que oscila entre 7,5 - 18 x 4 - 12,5 μm .

2.3.2.5.- *Gloeosporium* sp. Teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. y Schrenk.

Sturgess (1957), describe dos especies de *Gloeosporium*, aisladas de frutos de fresa, similares morfológicamente, sólo distintas por el número y tamaño de las conidias. Se forman dos tipos de micelio: uno hialino, de paredes delgadas, septado y de 1 - 3 μm de diámetro; el otro marrón oscuro, de paredes gruesas, con mayor número de septos y de 6 μm de diámetro. Produce conidias y clamidosporas. Las conidias son unicelulares, no septadas y cilíndricas, que se desarrollan directamente desde el micelio. Es frecuente la formación de gotas de aceite en el interior de la conidia. Su tamaño se encuadra en los márgenes siguientes 12,9 - 13,9 x 3,2 - 3,9 μm , en masa presentan un color rosa-salmón. Las clamidosporas son de forma irregular y tienen un diámetro de 4 - 6 μm .

Howard y Albregts (1984 b), indican que los acérvulos varían en forma y color. El tamaño medio de las conidias es de 12 - 21 x 3 - 4 μm y son hialinas, cilíndricas o elípticas. No se encuentra estado perfecto en frutos, pero en cultivo forma peritecio de color marrón oscuro o negro, globosos o alargados, de 85 - 300 μm de diámetro.

Sutton (1992), indica que *Gloeosporium* y *Colletotrichum* han sido, históricamente, dos géneros estrechamente relacionados, y que se diferenciaban por la presencia o ausencia de quetas. Aquellos hongos que no presentan quetas se encuadrarían en el género *Gloeosporium*. Pero esta asociación está basada en una premisa falsa. De una parte algunas especies de *Colletotrichum* no producen estas

estructuras. Además, las condiciones ambientales deben de jugar un papel importante en la producción de quetas, siendo el parámetro determinante la humedad atmosférica. Por último según Von Arx (1957), la especie tipo de *Gloeosporium* es de hecho una especie del género *Marssonina*. Este autor traslada especies de *Gloeosporium* a otros géneros, incluido *Colletotrichum*.

2.3.3.- MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

Los sistemas de identificación históricamente se han basado exclusivamente en criterios morfológicos y culturales o en una combinación de ambos. Actualmente, se comienzan a descubrir las limitaciones de dicha mecánica. Existen grupos de especies o complejos de especies en los cuales el uso del nombre específico tiene una escasa aplicación práctica. El caso que mejor ilustra lo inadecuado de este sistema es la controversia que rodea al problema de las especies de *Colletotrichum* patógenas de fresa, planta sobre la que se han detectado varias especies como *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*. Existen muchas razas con caracteres intermedios en cuanto a morfología y tamaño de las conidias, mostrando un amplio rango de variación en las características de las colonias. De esta forma la identificación como una u otra especie dependerá del criterio de mayor significancia para el investigador. La situación se complica debido al uso intermitente de *C. fragariae* B. para algunos aislados. Este nombre fue incluido como sinónimo de *C. gloeosporioides* por Von Arx (1957), pero más tarde Von Arx (1981) mantuvo que las especies eran distintas. Los intentos para distinguir los aislados de fresa mediante morfología de las conidias, características culturales, morfología de las quetas, presencia o ausencia del estado perfecto (*Glomerella*) y por su efecto sobre el huésped no han tenido el éxito esperado. La incapacidad para alcanzar un acuerdo en cuanto a la identidad de los agentes causales de antracnosis en fresa en las distintas partes del mundo tiene serias implicaciones. La legislación norte-americana se ha involucrado prohibiendo la introducción y movimiento de estas especies, de manera que no existe ningún método práctico que permita identificar sencillamente estos patógenos. Existen aún más datos para la controversia; Walker y colaboradores (1991) indican que *C. acutatum* fue muy probablemente descrito por primera vez en EEUU como *C. xanthii* Halst. en 1893, que es otra de las especies que von Arx (1957) considera como *C. gloeosporioides*

(Sutton, 1992).

A lo largo del tiempo diversos autores han estudiado las variaciones morfológicas, culturales y patogénicas entre las especies de *Colletotrichum* aisladas de fresa. Ferraz (1977), realiza este tipo de estudio, enfocado a diferenciar especies de *Colletotrichum* y *Gloeosporium*. Señala que la diferencia básica entre ambos es la ausencia de quetas en los acérvulos del segundo, pero debido a que la aparición de estas estructuras depende de factores fisiológicos y condiciones ambientales, se han producido transferencias entre ambos géneros. Mediante un estudio detallado de varios factores consigue encuadrar distintos aislados en el género correspondiente. Realiza la caracterización morfológica de los aislados (colonia, conidias, apresorios y esclerocios), ensayos biológicos (temperatura y fuente de carbono) y finalmente analiza la patogenicidad.

Delp y Milholland (1980 b), intentan distinguir los aislados mediante su virulencia sobre diferentes tejidos de fresa (estolones y frutos), llegando a las siguientes conclusiones: *C. dematium* no fue patogénico para estolones y si originó síntomas en fruto, todos los aislados de *C. fragariae* fueron muy virulentos (causando síntomas en estolones y frutos), mientras que los aislados correspondientes a *G. cingulata* y *C. gloeosporioides* mostraron una respuesta variable.

Smith y Black (1990 b), analizan 24 aislados de especies de *Colletotrichum*, para caracterizar las variaciones entre los mismos e identificarlos como una especie determinada utilizando los criterios establecidos por la literatura, así como determinar la respuesta de plantas de fresa. Los parámetros estudiados fueron: formación del estado perfecto, características conidiales, características del apresorio, producción de quetas, características culturales y respuesta a la variación de temperaturas y por último análisis de la virulencia. Determina que sólo los aislados que se corresponden con *C. gloeosporioides* presentan fase ascal, que encaja con la descripción de *Glomerella cingulata*. Las conidias de todos los aislados son de color rosa a anaranjado en masa, y debido a ello no se considera un carácter diferencial. Por la morfología se separaron dos grupos de conidias: cilíndricas y fusiformes. Los aislados que presentaban conidias del primer tipo se ajustaban a la descripción de *C. fragariae*, predominando en este caso las conidias con un extremo puntiagudo (80-100% de las

conidias de cada aislado), presentando el resto ambos extremos redondeados. El tamaño de las conidias, expresado como media para cada aislado, fue de 12,4-15,0 μm de longitud por 4,4-5,2 μm de ancho. El resto de los aislados se identificaron como *C. acutatum*. Presentan conidias fusiformes, es decir afiladas en punta en ambos extremos (64-100% de las conidias de cada aislado), siendo el resto puntiagudas en un extremo y redondeadas el otro o con ambos redondeados. El tamaño fue de 12,3 - 14,7 μm de longitud por 4,6 - 5,3 μm de ancho. Los aislados que presentaban fase ascal eran de conidias cilíndricas, siendo el 92% puntiagudas en un extremo. El tamaño fue de 12,9 - 16,1 μm de longitud por 4,4 - 5,4 μm de ancho. Muy pocos aislados forman apresorios, los de *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* son similares en forma. Las quetas sólo son producidas por los aislados que corresponden a *C. fragariae*, siendo más infrecuentes en cultivo que en planta. El color de la colonia es similar en el caso de *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*, que presentan tonos de gris a oliva, mientras que *C. acutatum* presenta una coloración de beige a rosada. Las variaciones en la temperatura no afectan significativamente el crecimiento radial, siendo el rango de crecimiento de *C. acutatum* significativamente menor. En cuanto a la susceptibilidad de los tejidos, indicar que las tres especies estudiadas provocan síntomas similares de podredumbre de fruto, reaislándose de las lesiones un aislado de características similares al utilizado para la inoculación. *C. acutatum* no originó mancha en las hojas, mientras que todos los aislados de *C. fragariae* causaron lesiones en peciolo después de ser inoculados mediante herida, algunos de los aislados de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* causaron lesiones en peciolo.

Gubler y Gunnell (1991), también analizan desde el punto de vista taxonómico las especies de *Colletotrichum* patógenas de fresa. Indica que mientras que *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* presentan una distribución mundial y son patógenos sobre varios cultivos, *C. fragariae* es patógeno exclusivamente de fresa y sólo ha sido detectado en EEUU. Los síntomas (podredumbre de corona, podredumbre de fruto y lesiones en estolones y peciolo) producidos por estas especies son similares. Según este autor *C. fragariae* está pobremente definido. Para diferenciar estas tres especies propone el cultivo del hongo en agar con hoja de fresa (AHF) con la finalidad de estudiar no sólo la morfología de las conidias y colonia sino también de las quetas, observando las características de forma, color, tamaño, número de septos y forma de agrupación.

De otra parte, para estos autores la temperatura óptima de crecimiento para *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* fue de 27°C, mientras que *C. acutatum* tiene un crecimiento más lento, estando su temperatura óptima entre 24 - 27°C. Llega a la conclusión de que *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* son dos especies distintas.

Para Howard y colaboradores (1992), *C. fragariae* y *G. cingulata* originan todas las fases de la enfermedad excepto la mancha irregular de las hojas y la podredumbre de yema, y *C. acutatum* no origina podredumbre de corona ni mancha negra de la hoja.

Denoyés-Rothan y Baudry (1995), llevan a cabo un estudio de características similares al realizado por Smith, analizando los mismos parámetros, para determinar que especies de *Colletotrichum* están presentes en Francia. Llega a la conclusión de que el 88% de los aislados se encuadrarían en el grupo de *C. acutatum*, debido a la presencia de conidias fusiformes y a su lenta velocidad de crecimiento. El resto se correspondería con *C. gloeosporioides*, debido a que presentan conidias cilíndricas, producen peritecio y tienen una alta velocidad de crecimiento. Su patogenicidad fue determinada sobre cinco cultivares de fresa, que variaban en su respuesta de resistencia. Se determina que los aislados de *C. acutatum* varían en su patogenicidad, mientras que los de *C. gloeosporioides* presentan baja patogenicidad.

Maas (1983), intenta la diferenciación entre las especies de *Colletotrichum* patógenas de fresa mediante el estudio de la patogenicidad y la electroforesis en gel de extractos de proteína. Los resultados de los análisis de proteínas confirmaron los test de patogenicidad, pero mostraron que *C. fragariae* presentaba un alto coeficiente de similaridad con *C. coccodes*, estando más alejado de *C. gloeosporioides*.

La técnica de análisis de isoenzimas está siendo usada actualmente por los especialistas en la obtención de datos útiles desde el punto de vista taxonómico, para identificar aislados desconocidos y para determinar la extensión de la variación genética dentro y entre poblaciones de hongos. También se utiliza para determinar el origen geográfico de los hongos (Micales et al., 1986).

Bonde y colaboradores (1991), utilizan la técnica de análisis de isoenzimas

para definir la variabilidad fenotípica de *C. acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*; incluyendo *C. coccodes* y *C. trifolii*, no patógenos de fresa para realizar comparaciones. Los valores intraespecíficos de los coeficientes de similitud indican una pequeña variación en *C. acutatum* y *C. fragariae*, mientras que existe una considerable variación en *C. gloeosporioides*. El bajo CS entre *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* sugiere que son especies distintas, estando esta última especie más cercana a *C. acutatum*. Esto indica que aunque morfológicamente *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* son difíciles de diferenciar, esta técnica nos facilita herramientas para conseguirlo.

Kaufmann (1996), sugiere que el análisis isoenzimático puede facilitar la caracterización intraespecífica dentro de *C. gloeosporioides*, para lo cual estudia aislados de esta especie procedentes de cinco huéspedes distintos.

Paterson y Bridge (1994), describen una metodología general para el análisis isoenzimático de esterases, fosfatasa y catalasa en hongos filamentosos. Siguiendo este método Buddie y colaboradores (en prensa), observan diferencias en las bandas obtenidas que no permiten separar las distintas especies del género de forma clara, detectándose en estudios paralelos que no existe relación entre la capacidad patogénica de los aislados y la segregación de isoenzimas.

Sreenivasaprasad y colaboradores (1992), estudian la variación de la secuencia de ADN para determinar las relaciones entre las especies de *Colletotrichum* patógenas de fresa, sobre todo para llegar a diferenciar *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*. Llegan a la conclusión de que los aislados de estas dos especies difieren entre sí por sólo 3-7 bases, mientras que *C. acutatum* difiere de ambos por 36-37 bases. De otra parte los aislados europeos de *C. acutatum* se diferencian del resto en 8-11 bases.

Masel (1993), utilizando electroforesis en gel para la detección de minicromosomas, pretenden diferenciar en dos grupos distintos las especies de *C. gloeosporioides* que originan antracnosis en plantas del género *Stylosanthes*, en Australia. Llegan a la conclusión de que todos los aislados de *C. gloeosporioides* presentan este tipo de cromosomas, lo que sucede también en las especies *C. crassipes*, *C. dematium* y *C. truncatum*. Las especies de *C. gloeosporioides*

australianas presentan una gran variación en cuanto al número y tamaño de sus microcromosomas, lo que permite separarlas en dos grupos con distinto comportamiento patogénico; pero no sucede igual con los aislados provenientes de otras partes del mundo, por lo que esta técnica parece que tiene escaso interés para estudios epidemiológicos posteriores a nivel global.

En 1995, Cook y colaboradores describen la utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de especies de *Colletotrichum*. Esta técnica permite detectar tanto infecciones latentes en plantas de fresa como identificar el patógeno en cultivo puro, diferenciando entre *C. acutatum* y el resto de las especies del hongo.

2.3.4.- FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO DEL HONGO

Uno de los factores más estudiados "in vitro" es la temperatura óptima de crecimiento de las distintas especies.

Sturgess (1957) analiza los rangos de temperatura que determinan un mejor crecimiento de *Gloeosporium*. El crecimiento micelial se incrementa al aumentar la temperatura desde 14°C hasta la óptima de crecimiento que es de 28°C; comprobando que por encima de esta el crecimiento disminuye. Comprueba que las esporas y el micelio continúan viables después de tres días de exposición a -35°C. Cuando una suspensión de conidias se calienta durante diez minutos en baño de agua, el punto de muerte está entre 50 y 60°C.

Para Simmonds (1965), la temperatura óptima de crecimiento de *C. dematium* se encuentra entre 27,5 - 29,5°C; pudiendo soportar un máximo de 37°C.

La temperatura óptima para el crecimiento y la esporulación de *C. fragariae* sería de 30°C, no existiendo crecimiento a 5 y 40°C; y muy poco crecimiento a 10 y 35°C (Horn y Carver, 1963). Según Gullino y colaboradores (1985), *C. gloeosporioides* presenta el máximo crecimiento a 25°C. En el caso de *C. acutatum* la temperatura óptima sería de 25°C, no existiendo crecimiento a 5 y 35°C (Wilson et al., 1990).

Smith y Black (1990 b) y Denoyés-Rothan y colaboradores (1996), indicaron que la temperatura óptima de crecimiento para *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* es de 28°C, observando que la tasa de crecimiento de este último era sensiblemente menor a todas las temperaturas, pero sobre todo a 28 y 32°C.

Eastburn y Gubler (1992), estudian la influencia de la humedad y temperatura del suelo en la supervivencia de *C. acutatum*, observando que esta es superior en suelos secos y fríos, disminuyendo al aumentar ambos parámetros.

En cuanto al efecto del pH en el crecimiento micelial, Gullino y colaboradores (1985) indicaron que el óptimo, en agar malta, es de 5,7. Estos autores utilizan varios medios de cultivo, observando que *C. gloeosporioides* crece mejor en agar ocho vegetales, seguido de agar malta, agar zanahoria y patata dextrosa agar, presentando niveles bajos en agar czapek..

Gubler y colaboradores (1988), estudiaron el efecto de los nutrientes en la germinación de conidias de *C. acutatum*. Observaron que el rango de germinación es bajo en suspensión con sales (NH_4NO_3 ; $\text{KH}_2\text{O PO}_4$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y FeSO_4), glucosa y sales + glucosa. Si la suspensión contiene peptona el porcentaje de germinación es superior. Las esporas que germinan en ausencia de este compuesto presentan tubos de germinación cortos y forman apresorios. Si la peptona está presente se forman tubos de germinación más largos, iniciándose la formación de colonias después de 16 - 24 horas.



3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS

3.1.1.- DESARROLLO DE LOS SÍNTOMAS EN AMBIENTE CONTROLADO.

3.1.1.1.- Podredumbre de corona

Con el fin de describir los síntomas y la evolución de podredumbre de corona (ACR), se llevó a cabo en invernadero una experiencia en macetas, en las que se observó el desarrollo de dicha sintomatología en suelo de turba estéril.

El material vegetal utilizado fueron plantas frescas del cultivar "Chandler", libres del patógeno, lo que se determinó mediante muestreo estratificado, tomando de cada caja de 250 plantas, cinco manojos de 25 y de cada uno de ellos cinco. Antes de iniciar el proceso de inoculación se eliminaron todos los peciolos viejos, considerando como tales aquellos que no portaban hojas. Las plantas se lavaron con hipoclorito sódico (20%) durante 2 min., enjugándose dos veces bajo agua corriente. Una vez secas, se inoculan por inmersión en suspensión de conidias de *Colletotrichum* spp. aislado de corona de fresa (origen del aislado: planta del cultivar "Chandler", localizada en campo de producción de la zona de Lepe - Huelva, aislado al que se denomina CT-2), del que se obtuvo un cultivo monospórico, crecido durante 7 días sobre patata dextrosa agar al que se añaden 2 g/l de extracto de levadura (PDA-Y) en cámara iluminada (Tuite, 1969). La concentración del inóculo fue de 10^4 conidias/ml y el tiempo de inmersión de 3 minutos. Tras la inoculación las plantas se mantuvieron 24 h. a temperatura ambiente, trasladándose posteriormente a invernadero con temperaturas medias de 28°C. La experiencia se repitió dos veces.

Para determinar la evolución de las lesiones se extraen diez plantas cada cinco días, contando desde el momento de la inoculación. A continuación, las plantas son lavadas para eliminar los restos de turba. Se procede a realizar cortes longitudinales a las coronas, observándose el estado de los tejidos de las mismas. En caso de presentar necrosis se determina la zona de inicio de la misma (estolón, yema o lateral), calculándose el porcentaje de corona afectada, mediante conteo en plantilla milimetrada de dicha superficie. A continuación se realizan aislamientos de tejido, para confirmar la presencia del patógeno.

3.1.1.2.- Síntomas en estolones y peciolo

Para determinar los síntomas en estolones y peciolo se llevaron a cabo dos tipos de inoculación sobre plantas del cultivar "Chandler":

a.- Inoculación mediante pulverización de suspensión de conidias. A partir de un cultivo de CT-2, crecido durante 7 días sobre PDA-Y, se obtuvo una suspensión de conidias (concentración 10^6 conidias/ml), a la que se añadió una gota de Tween-20 por cada 100 ml. Se pulverizaron diez plantas en fase de estolonamiento. Una vez inoculadas se llevaron a cámara de crecimiento a 25°C y manteniendo mediante embolsamiento un 100% HR, durante 48 h. Posteriormente fueron mantenidas a 25°C y 70% HR durante 30 días para la observación de síntomas (Delp y Milholland, 1980 b).

b.- Inoculación mediante inyección de suspensión de conidias. La suspensión de conidias para la inoculación fue preparada como se indica en "a". Se inyectaron 0,2 ml directamente en los tejidos con una jeringa de 1cc. La zona en la que se realizó la inoculación fue cubierta con algodón esterilizado, que se mantuvo humedecido durante 48 h. Durante todo el tiempo que duró la experiencia las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento a 25°C y fotoperíodo de 16 h. luz (Maas, 1978 y Smith et al., 1990 a).

3.1.1.3.- Síntomas en fruto.

Frutos verdes y maduros de los cultivares "Chandler", "Oso Grande" y "Pájaro" fueron desinfectados superficialmente mediante inmersión durante 1 minuto en alcohol etílico 95%, seguido por 4 minutos en solución de hipoclorito sódico al 2%. Fueron enjugados 4 veces en agua destilada estéril y secados al aire (Howard, 1972 y Howard y Albregts, 1984 a).

La inoculación se llevó a cabo mediante la colocación sobre los frutos de un disco de micelio de 7 mm de diámetro, que se obtuvo del borde de una colonia de CT-2 en crecimiento sobre PDA-Y (Simmonds, 1965). Los controles consistieron en frutos sobre los que se colocó un disco de medio libre de micelio.

Los frutos inoculados se dispusieron en cajas de plástico donde se mantuvo un 100% HR durante 5 días, con una temperatura de 25°C y bajo luz fluorescente (Howard, 1972). Se dispusieron cuatro frutos por caja y tres repeticiones por cultivar y tipo de fruto.

3.1.2.- DESARROLLO DE LOS SÍNTOMAS EN CAMPO.

El estudio de la sintomatología de las distintas fases de la antracnosis, se llevó a cabo mediante experiencias de campo que se realizaron durante tres años consecutivos en la finca experimental "El Cebollar", situada en Moguer (Huelva) y dependiente del Centro de Investigación Agraria "Las Torres-Tomejil" (Alcalá del Río - Sevilla).

El diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro repeticiones, las parcelas elementales estaban compuestas por dos lomos de 8 m. de longitud, con 140 plantas, constituido por dos hileras cada uno. Se utilizaron plantas de fresa del cultivar "Oso Grande", obtenidas de viveros de altura (Valladolid), libres del patógeno, lo que se determinó mediante aislamientos de tejidos de plantas elegidas mediante muestreo estratificado, tomando de cada caja de 250 plantas, cinco manojos de 25 y de cada uno de ellos cinco plantas.

Antes de la plantación se procedió a la preparación del suelo, abonado de fondo y estercolado. El alomado se realizó mecánicamente, colocándose simultáneamente las cintas de riego por goteo y el plástico negro de cobertura del lomo o acolchado.

Las plantas se inocularon artificialmente por inmersión en suspensión de conidias de CT-2 (como se indica en el apartado 3.1.1.1.). La concentración del inóculo fue de 10^4 conidias/ml. y el tiempo de inmersión de 3 minutos. Tras la inoculación, se dispusieron las plantas a temperatura ambiente (25°C) a 100% HR durante 48 horas (Smith y Black, 1987). Se dispuso de plantas testigo que sufrieron inmersión en agua y que se mantuvieron en las mismas condiciones.

La plantación se realizó a finales de Octubre de forma manual. Una vez finalizada se instaló el riego por aspersión que se mantuvo durante quince días, fecha en la que se continuó con el riego localizado, mediante el cual se realizó el aporte de nutrientes de la forma habitual en la zona. Los lomos se cubrieron a principios de Diciembre mediante el sistema de "microtuneles" o "tunelillos", utilizando un plástico de 300 galgas, con lo cual se favoreció el forzado del cultivo.

3.2.- CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSAL.

Para la identificación del hongo, agente causal de antracnosis en fresa, que se aísla de forma continuada en plantas y frutos de fresa en la zona de Huelva se han utilizado criterios morfológicos, culturales, patogénicos así como técnicas serológicas mediante comparación con aislados ya caracterizados y registrados en la colección de cultivos del Instituto Micológico Internacional (I.M.I.), con sede en Londres (Gran Bretaña).

3.2.1.- Cultivos del hongo

Se utilizaron 15 aislados de *Colletotrichum* spp., obtenidos de fresa (Tabla 5). Se obtuvieron cultivos monospóricos de cada aislado, que se almacenaron a 4°C en agar-agua. Cultivos frescos de cada uno se desarrollaron en PDA-Y antes de los distintos estudios (Smith y Black, 1990 b).

3.2.2.- Características conidiales

Cada aislado se creció en PDA-Y durante 9 - 12 días bajo luz continua a 25°C. Se preparó una suspensión de conidias en agua destilada estéril, siendo determinada la forma de las conidias mediante el examen de 100 de ellas elegidas al azar, situándolas en una de las categorías: 1) cilíndricas con ambos extremos redondeados; 2) intermedia con un extremo en punta y el otro redondeado; y 3) fusiforme con ambos extremos puntiagudos. El tamaño de las conidias se determinó midiendo la longitud y el ancho de 25 conidias elegidas al azar de cuatro subcultivos del mismo aislado, expresándose el resultado como valor medio. El color de las

conidias se determinó mediante el examen de una masa de conidias sobre una superficie blanca (Denoyés-Rothan y Baudry, 1995 y Smith y Black, 1990 b).

Nº I.M.I.	DENOMINACIÓN	PAÍS DE ORIGEN	AISLADO DE :
324984	G. cingulata	EEUU	fresa
324988	G. cingulata	EEUU	fresa
324993	C. acutatum	EEUU	fresa
324995	C. acutatum	EEUU	fresa
345026	C. acutatum	España	fresa
345029	C. acutatum	Costa Rica	fresa
345051	G. cingulata	Canadá	fresa
345581	C. miyabeana	Nueva Zelanda	
348152	C. fragariae	EEUU	fresa
348167	C. fragariae	EEUU	fresa
348172	C. fragariae	EEUU	fresa
348499	C. acutatum	Francia	fresa
360086	C. acutatum	Japón	fresa
364856	??	España	fresa
367467	C. acutatum	Reino Unido	fresa
	CT.2	España (Huelva)	fresa

TABLA 5.- Fuente y designación de los aislados de *Colletotrichum* spp.

3.2.3.- Producción del estado ascá

Cada aislado fue observado semanalmente durante dos meses para determinar la presencia de peritecios creciéndolos en "oatmeal agar" (OMA): harina de avena 45 g, agar 13 g en 1l de agua y en PDA-Y a 25°C, con fotoperíodo de 12 h luz (Denoyés-Rothan y Baudry, 1995).

3.2.4.- Características de los apresorios

Los apresorios se estudiaron usando una técnica de cultivo en porta. Se realizaron de cada uno de los aislados colocando sobre un porta estéril una gota de agar-agua enfriado (25 g de agar por litro) y transfiriendo una gota de suspensión de conidias sobre él. Posteriormente se cubre y se mantiene en placa Petri, que sirve como cámara húmeda, durante 7 días. Un mínimo de 25 apresorios se examinan por cada aislado (Smith y Black, 1990 b).

3.2.5.- Producción de quetas

Para el estudio de las quetas se utilizó el método descrito por Gubler y Gunnell (1991). Cada aislado se desarrolló en agar hoja de fresa (AHF) bajo luz continua a 25°C, durante 21 a 30 días. El medio de cultivo se preparó según la siguiente fórmula: se maceran 300 g de hoja de fresa en 500 ml de agua destilada, calentándose durante una hora, al filtrado se añaden 500 ml de agua destilada en los que se disuelven 12 g de agar; enrasándose hasta de 1 l, posteriormente se autoclava 20 min a 120°.

3.2.6.- Características culturales y respuesta a la temperatura en PDA-Y

Colonias individuales de cada aislado se obtuvieron transfiriendo un disco de micelio de 7 mm de diámetro sobre PDA-Y en placa Petri de 90 mm de diámetro, manteniéndose en luz continua a 25°C. El color de la colonia se determinó examinando los cultivos sobre una superficie blanca después de 7 días de incubación (Smith y Black, 1990 b). De igual forma se determinó la velocidad de crecimiento de los aislados midiendo diariamente el diámetro de la colonia, dicha velocidad se expresa en mm/día. Los resultados se expresan como media de dos ensayos con diez repeticiones cada uno.

Se determinó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento radial de los aislados creciendo cuatro cultivos de cada uno en oscuridad a 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36°C. Las colonias se iniciaron con un disco de micelio invertido de 7 mm de diámetro, sobre PDA-Y. El diámetro de cada colonia resultante se midió a los 5 días de crecimiento a cada temperatura (Smith y Black, 1990 b).

Se estudió el crecimiento de los aislados en los siguientes medios de cultivo: OMA, AHF, PDA y agar V8 (100 ml de zumo 8 vegetales, 2 g CO₃Ca, 17 g agar, enrasando con agua a 1 l). Los resultados se expresan como diámetro medio de cinco repeticiones tras 7 días de crecimiento a 25° y luz continua (Gullino et al., 1985).

3.2.7.- Variaciones patogénicas entre los aislados

Inóculo e inoculación: Se utilizaron 74 aislados del género *Colletotrichum*, obtenidos del I.M.I.; que fueron crecidos en PDA-Y durante siete días bajo luz continua. Las conidias para la inoculación se lavaron de la superficie de las placas, filtrando a través de gasa estéril, suspendiéndose en agua destilada estéril conteniendo dos gotas de Tween 20 por litro. La concentración se ajustó mediante conteo con cámara Thoma a 10⁴ conidias/ml. Las plantas se inocularon mediante inmersión durante 3 min. en dicha suspensión. Después de la inoculación se plantaron en macetas de 20 x 20 cm y se llevaron a cámara húmeda (100% HR) a 25°C durante 48 horas, permaneciendo en observación durante 30 días. Se realizaron aislamientos de tejidos de corona y raíces para la determinación del agente causal (Gubler et al., 1988).

Material vegetal: Las plantas de fresa utilizadas en esta experiencia fueron de los cultivares "Chandler", "Pájaro", "Camarosa", "Selva" y "Oso Grande", cuyo estado sanitario se testó como se indica en el apartado 3.1.1.1. Se dispusieron diez réplicas por cultivar y aislado.

Escala de severidad de la enfermedad: Para la valoración del desarrollo de las lesiones se aplica la escala de Delp y Milholland (1980 b) modificada:

- 1 = plantas sanas sin síntomas en corona
- 2 = plantas asintomáticas de cuya corona se aísla el patógeno inoculado
- 3 = plantas asintomáticas con necrosis en corona que ocupan el 5 - 15% de su superficie
- 4 = plantas asintomáticas con necrosis en corona que ocupan entre el 15 - 25% de su superficie
- 5 = plantas asintomáticas con necrosis en corona que ocupan entre el 25 - 50% de su superficie

- 6 = plantas asintomáticas con necrosis en corona que ocupan entre el 50 - 75% de su superficie
- 7 = plantas sintomáticas con necrosis en corona que ocupan más del 75% de su superficie
- 8 = plantas muertas de cuya corona se aísla el patógeno.

Se realizaron en todos los casos aislamientos del tejido radicular, añadiéndose medio punto al valor correspondiente en la escala en el caso si se detectaba el patógeno. El índice de severidad (IS) se expresa como media de las repeticiones.

Susceptibilidad de frutos: La capacidad de cada aislado para originar podredumbre de fruto se testó en el cultivar "Oso Grande". Los frutos, en estado de maduración intermedio, se desinfectan como se indica en el apartado 3.1.1.3. A continuación se inoculan mediante colocación de disco de micelio de 7 mm de diámetro, tomados del halo de crecimiento en cultivos de siete días. Los frutos, a razón de cinco por aislado, se transfieren a cajas de plástico (tres repeticiones) con papel de filtro humedecido para obtener una alta humedad relativa, manteniéndose en cámara iluminada a 25°C durante cinco días. Los controles se realizaron con frutos tratados de igual forma, sobre los que se colocó un disco de medio, que no contenía al patógeno.

Los síntomas se caracterizan como presencia o ausencia del patógeno, realizándose en todos los casos aislamientos de tejidos para determinar la presencia. A los cinco días se midió el diámetro de la lesión.

3.2.8.- Identificación mediante la utilización de anticuerpos monoclonales

Discos de 1 cm² de diámetro, obtenidos del borde de colonias de cada uno de los aislados, después de haber sido crecidos durante 7 días con fotoperíodo de 12 h, se depositan en tubos que contienen 1 ml de agua destilada estéril. Alíquotas de 100 µl se distribuyen en placas multipocillos, incubándose durante 1 hora a 37°C. Las paredes de los pocillos se lavan tres veces con tampón fosfato salino que contiene Tween 20 (PBSt), a continuación se añaden 100 µl del anticuerpo monoclonal correspondiente (MAFF 26, para *C. acutatum* o MAFF 27 para *Colletotrichum* spp.) más 4 µl de anti-rat (Sigma A6066), a cada uno de los pocillos, incubándose durante

1 h a 37°C. Después de un triple lavado con PBSt, se añaden 100 μ l de tampón substrato a cada celda. Se incuban las placas a temperatura ambiente durante 2 h, realizándose la lectura a 405 nm. Se considera positivo cuando la lectura es el doble del control con agua destilada estéril (Hughes et al., 1996).

3.3.- EPIDEMIOLOGÍA

3.3.1.- EXPERIENCIAS EN CAMPO.

El estudio de la influencia medioambiental en el desarrollo de las distintas fases de la antracnosis en el tiempo, se llevó a cabo mediante experiencias de campo que se realizaron durante tres años consecutivos en la finca experimental "El Cebollar". El diseño experimental de la parcela y el manejo de las plantas se realizó como se indica en el apartado 3.1.2. Tras la inoculación, se dispusieron dos grupos de plantas en ambientes distintos: cámara frigorífica (2°C) durante 7 días hasta plantación (Gubler et al., 1988) y a temperatura ambiente (25°C) a 100% HR durante 48 horas (Smith y Black, 1987). Se dispuso de plantas testigo que sufrieron inmersión en agua y que se mantuvieron en las mismas condiciones.

Los datos meteorológicos fueron facilitados por el Centro Meteorológico de Andalucía Occidental y recogidos en el observatorio de la Central Térmica de Huelva, el disponible más cercano a la zona donde se realizó la experiencia.

3.3.2.- TOMA DE MUESTRAS.

De cada parcela elemental se tomó de forma aleatoria un 10% de plantas como unidad de muestreo. Las observaciones se realizaron con carácter semanal, se contabilizó el número de hojas, flores, frutos verdes y frutos maduros; siendo recogidos y posteriormente procesados en laboratorio.

Una vez comenzada la producción de frutos se recolectaron los de las plantas muestra, con la periodicidad indicada. Los datos de producción media se expresan en

gramos/planta, hallándose la media obtenida para las cuatro repeticiones de las plantas inoculadas y testigos. La incidencia de podredumbres de fruto se expresa como porcentaje de peso afectado sobre el total.

Todas las plantas muertas aparecidas en las parcelas fueron retiradas. La incidencia de ACR se expresa como porcentaje de plantas muertas sobre el total.

3.3.3.- PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE PLANTAS EN LABORATORIO

Una vez descritas las lesiones en las distintas partes de la planta y con el fin de identificar el agente causal de las mismas, se realizaron cortes de 3 a 5 mm en el borde de las lesiones, se introdujeron en hipoclorito sódico al 2% durante 30 segundos, lavándose en agua destilada estéril, disponiéndose a continuación en placas Petri conteniendo PDA-Y (Tuite, 1969).

Las placas se incubaron en luz continua a 25°C, durante siete días para la posterior identificación de las colonias, mediante microscopía óptica.

3.4.- DISEMINACIÓN DEL PATÓGENO

Para determinar la influencia de fuentes de inóculo procedentes de plantas infectadas sobre plantas sanas, se ha observado la aparición de síntomas de antracnosis, como podredumbres de fruto y ACR, en plantas sanas que comparten la parcela con plantas inoculadas artificialmente, en parcelas situadas en la finca "El Cebollar" (apartado 3.1.2.). Se estableció un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones, en el que las plantas inoculadas más cercanas a las no inoculadas se situaban a una distancia de 2,5 m.

Se evaluó la incidencia de ACR como porcentaje de plantas muertas y el porcentaje de frutos con síntomas sobre el total. El muestreo se realizó como se indica en el apartado 3.3.2. Al final de cada campaña se realizan aislamientos de tejidos de corona sobre PDA-Y, para determinar la presencia/ausencia del patógeno.

3.5.- CICLO DE LA ENFERMEDAD

3.5.1.- EXPRESIÓN DE LOS SÍNTOMAS EN CAMPO

La determinación del momento de aparición de cada uno de los síntomas característicos de antracnosis en relación con el estado fenológico del cultivo se ha realizado mediante la observación y toma de muestras (apartado 3.3.2), en la parcela situada en la finca experimental "El Cebollar", cuyo diseño y preparación se describieron en el apartado 3.1.2. Las experiencias se repitieron durante tres años consecutivos.

Se relacionan el tiempo transcurrido desde la plantación con el desarrollo fenológico del cultivo, indicándose en que momento aparecen los síntomas.

3.5.2.- FUENTES DE INÓCULO

3.5.2.1.- Supervivencia en suelo

Para determinar la capacidad del patógeno para mantenerse en suelo y desde dicho entorno infectar plantas sanas, iniciando la enfermedad, se han llevado a cabo distintas experiencias en ambiente natural y controlado.

3.5.2.1.A.- Estudios de campo.

Durante tres años consecutivos se repitió el cultivo de fresa en parcelas de la finca experimental "El Cebollar", en las que nunca se había realizado desinfección de suelo. Se tomaron muestras de dicha parcelas con periodicidad mensual durante la campaña, así como al final y al inicio de cada una para detectar la presencia del patógeno.

Las muestras se tomaron en zig-zag, dos por parcela elemental, con una sonda vertical graduada de 0 a 20 cm de profundidad.

De igual forma, para detectar la presencia/ausencia del patógeno en suelo procedente del entorno radicular de las plantas muertas se realizaron aislamientos de dichas muestras, a razón de dos muestras por planta.

3.5.2.1.B.- Experiencias en ambiente controlado.

Se realizaron en macetas de plástico de 20 x 20 cm con dos tipos de medio: turba y suelo franco-arenoso. Fueron esterilizados en autoclave (120°C durante 1 h.). Una vez enfriados se inocularon por adición de una suspensión de conidias de CT-2 (10⁵ conidias/ml.), añadiendo 100 ml de la suspensión para un volumen de suelo de 500 ml (Tello et al., 1991). Se incubó esta mezcla durante 7 días en estufa a 25°C. Antes de disponer el suelo en macetas se realizaron aislamientos de las muestras, sobre el medio descrito en el apartado 3.5.2.1.C., para determinar la presencia del patógeno. Sobre este suelo se plantaron plantas de fresa del cultivar "Chandler" procedentes de una partida de plantas obtenidas de cultivo de meristemos. Se llevaron a cámara de crecimiento (75% HR y 25°C) durante 48 h., trasladándose posteriormente a invernadero con temperatura media de 28°C. Durante 30 días se observaron las plantas para determinar la aparición de los síntomas, al finalizar este período se realizaron aislamientos de tejidos y de suelo para detectar la presencia del patógeno. La humedad del suelo se mantuvo con riegos alternos con agua estéril.

En todos los casos se dispusieron de diez repeticiones por cultivar y tipo de suelo, así como de testigos en suelos esterilizados no inoculados, uno de los cuales contenía plantas sanas y el otro plantas inoculadas por inmersión (apartado 3.1.1.1). La experiencia se repitió dos veces.

Los resultados se expresan como número de plantas sintomáticas y de las que se aísla el patógeno. En el caso de suelos, como número de propágulos por gramo de suelo (NPP/g).

Para determinar el tiempo que el patógeno puede permanecer en el suelo en ausencia de planta se inoculó un suelo franco-arenoso, previamente esterilizado, con una suspensión de conidias de CT-2, tal y como se indicaba anteriormente. Muestras de este suelo se mantienen en dos condiciones: luz continua y oscuridad, en ambos

casos a 25°C. Con periodicidad quincenal se toman muestras para determinar el número de propágulos presentes en las mismas. La experiencia se dio por finalizada tras tres muestreos consecutivos sin re-aislar el patógeno.

3.5.2.1.C.- Aislamientos de suelo

Las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente, tamizándose a continuación con una criba de malla de 2 mm (Tello et al., 1991).

Los aislamientos de suelo se realizaron siguiendo la metodología indicada por Gubler y colaboradores (1988). El medio de cultivo utilizado fue dextrosa peptona agar más extracto de levadura (DPA-Y), con la siguiente composición en 950 ml. de agua destilada:

Agar-Agar.....	20 g
D-glucosa.....	5 g
Bacto Peptona.....	1 g
Extracto de levadura..	2 g
Propionato sódico.....	1 g
NH ₄ NO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ -7H ₂ O.....	0,5 g

El medio se autoclavó durante 20 min. a 120°C y se enfría a 45° en baño termostatzado. A esta temperatura se le añaden los siguientes antibióticos: clorotetraciclina (20 mg) y estreptomícina (30 mg). En 50 ml. de agua destilada se diluyen 5 g. de bilis fresca de buey (Oxgall de Difco), autoclavándose a 110°C, durante 20 min., esta solución; una vez enfriada se adiciona al medio, añadiendo por último 5 ppm de benomilo. Una vez el medio así preparado se dispensó en placas Petri. Se pesan 15 g. de cada muestra de suelo que se añaden a 150 ml de agar-agua (0,1%). Se preparan dos diluciones 1:10 de cada suspensión para obtener concentraciones 1:10² y 1:10³ g de suelo/ml., tomándose 0,5 ml de cada dilución que se extienden en la superficie de la placa Petri conteniendo el medio, realizándose tres

repeticiones por dilución y muestra. La presencia de *Colletotrichum* spp. se evalúa después de 7 días de incubación bajo luz continua a 25°C.

3.5.2.2.- Supervivencia del inóculo en plantas de fresa

McInnes y colaboradores (1992), sugieren como única fuente de inóculo de *Colletotrichum* spp., cuando provoca ACR, a la propia planta de fresa. Para determinar si las plantas son portadoras del patógeno, se han muestreado durante cuatro años plantas procedentes de viveros de altura y de planteras locales antes de su introducción en campos de producción (Septiembre-Octubre). Se realizó un muestreo aleatorio y secuencial, oscilando el número de muestras por vivero o plantera entre 30 y 50 unidades.

Se realizó el seguimiento del material vegetal durante los meses siguientes a la plantación para determinar si se producían síntomas de ACR, tanto en plantas procedentes de viveros y planteras donde se detectó el patógeno como en aquellos en los que el resultado fue negativo. Para ello se realizaron visitas quincenales, tomándose muestras de las plantas que presentaban síntomas.

Para determinar la presencia del patógeno en los tejidos de la corona o raíces de las plantas muestreadas se realizaron aislamientos de los mismos sobre PDA-Y (apartado 3.3.3). Los datos se expresan como porcentaje de plantas infectadas sobre el total muestreado.

La posible presencia del patógeno en el suelo adherido a la planta se estableció, cuando el estado de las muestras lo permitió, tomando de cada una cinco plantas (mediante muestreo estratificado como se indica en el apartado 3.1.1.1), a las que se retiraron peciolo y raíces, las coronas resultantes fueron agitadas en 150 ml de agua destilada estéril durante dos horas. Alícuotas de 0,5 ml de la suspensión resultante se extendieron sobre placas Petri conteniendo DPAY (3 placas por muestra), incubándose a 25°C durante 7 días. Los resultados se presentan como presencia o ausencia en cada muestra (Gubler et al., 1988).

Al realizar cortes de corona se determinó el estado de los tejidos internos,

sintomáticos o no, así como el punto de inicio de las necrosis. Los resultados se expresan como porcentajes sobre el total de las plantas de las que se aísla el patógeno.

3.2.2.3.- Huéspedes intermediarios

Algunos autores señalan la existencia de distintas plantas que pudieran servir como huéspedes de *C. fragariae* (Brooks, 1931; Delp y Milholland, 1981 y Gullino et al., 1985). Howard y Albregts (1973), indican que *Cassia obtusifolia* podría actuar como reservorio de dicho patógeno, pero no se tiene constancia de que esta especie vegetal se encuentre en España.

Desde 1992, se han venido realizando prospecciones en las zonas freseras de la provincia de Huelva entre distintas adventicias, especies de jara (*Cistus* spp.), eucaliptos (*Eucalyptus* spp.) y restos de pino (*Pinus* spp.); con la intención de detectar la presencia de hongos del género *Colletotrichum*.

De otra parte, el equipo del departamento de Fitopatología del C.I.F.A. "Las Torres - Tomejil", que lleva a cabo el proyecto: "Estudio integrado de las enfermedades y plagas del arándano en Andalucía Occidental", detectó en 1997 sobre hojas de arándano (*Vaccinium* spp.) una serie de manchas de las que se aisló, sobre PDA (patata dextrosa agar) un hongo del género *Colletotrichum*. Se identificó mediante estudios morfológicos y por medio de la técnica de anticuerpos monoclonales; observándose igualmente sus características culturales y respuesta a la temperatura (apartado 3.2.). Para determinar su patogenicidad en fresa se realizaron inoculaciones en fruto y planta (apartado 3.1.1.).

3.6.- MEDIDAS DE CONTROL

3.6.1.- CONTROL QUÍMICO

3.6.1.1.- Fungotoxicidad "in vitro"

La eficacia de varias moléculas fungicidas de actividad conocida contra

Colletotrichum spp., así como otras utilizadas en el cultivo de fresa, se testó sobre PDA en placas Petri. Discos de micelio del aislado de 7 mm de diámetro, tomados de la zona de crecimiento de un cultivo, de siete días de edad, se transfirieron a placas que contenían el medio de cultivo con concentraciones de 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm de los diferentes fungicidas. La medida del crecimiento radial se tomó a los 7 días de incubación a 25°C en cámara iluminada. Así mismo, suspensiones de conidias del patógeno (10^3 conidias/ml) se distribuyeron (0,1 ml/placa) sobre la superficie de las placas que contenían distintas concentraciones de los diferentes fungicidas, contándose el número de colonias desarrolladas a los 3 días de incubación, comparando con el número de colonias desarrolladas en los testigos. En ambos casos se dispusieron cinco repeticiones por tratamiento y se repitió dos veces. Los resultados se expresan como dosis efectiva al 50% (DE_{50}) y concentración mínima inhibitoria (CMI), indicándose las concentraciones en partes por millón (ppm) (Horn et al., 1972 y Gullino et al., 1985).

Las moléculas fungicidas testadas fueron las siguientes: **benomilo**, **bitertanol** (1-(4-fenifenoxi) 3,3-dimetil 1-(1H 1,2,4-triazol 1-il) 2-butanol), **captan**, **carbendazima**, **6% cloranfenicol + 41% oxiquinoleato + 20% quinosol** (TERLAI), **clortalonil**, **diclofluanida**, **dicloran**, **hexaconazol** ((RS) 2-(2,4-diclorofenil) 1-(1H-1,2,4-triazol 1-il) hexan 2-ol), **imazalil** (1-(2-(2,4-diclorofenil) 2-(2-propeniloxi) etil) 1H-imidazol), **metil-tolclofos**, **propiconazol**, **quintoceno** (PCNB, Pentacloronitrobenceno), **tiabendazol** (2-(4-tiazolil) bencimidazol) y **vinclozolina**.

3.6.1.2.- Ensayos de control químico en ambiente controlado

La eficacia de los fungicidas en el control de ACR en invernadero se testó sobre plantas de los cultivares "Pájaro", "Chandler" y "Oso Grande" procedentes de viveros de altura, cuyo estado sanitario se determinó como se indica en el apartado 3.5.2.2..

Las plantas se inocularon artificialmente por inmersión en suspensión de conidias del aislado CT-2 (10^4 conidias/ml), durante tres minutos., manteniéndose durante 7 días a 2°C en cámara frigorífica.

Se aplicaron tratamientos químicos en pre-siembra, por inmersión de la planta en solución de fungicidas, a dos tiempos 15 y 30 minutos. Los fungicidas y las dosis empleadas fueron los siguientes:

	DB	DA
Hexaconazol.....	10 ppm	20 ppm
Propiconazol.....	20 ppm	100 ppm
Tiabendazol.....	100 ppm	200 ppm
Imazalil.....	10 ppm	100 ppm
Terlaí	20 ppm	100 ppm
Bitertanol.....	20 ppm	100 ppm
Carbendazima...	100 ppm	200 ppm

Las plantas se dispusieron en macetas de plástico de 20x20 cm de diámetro, conteniendo turba negra. Se dispusieron cinco repeticiones por tratamiento, llevándose a cabo dos veces. Los controles consistieron en plantas inoculadas no tratadas y plantas no inoculadas.

Se situaron en invernadero, realizándose observaciones semanales para determinar la aparición de síntomas así como el estado fenológico de las plantas.

La experiencia se dio por finalizada a los 30 días de la plantación. Se realizaron aislamientos de tejido para determinar la presencia/ausencia del patógeno.

Los resultados se expresan como porcentaje medio de plantas muertas sobre el total.

3.6.1.3.- Estudio de la eficacia de los fungicidas en condiciones de campo

La parcela se situó en la finca experimental "El Cebollar" (Moguer, Huelva). El diseño fue de bloques al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Las parcelas elementales estaban compuestas por dos lomos de 8 m. de longitud, con dos hileras de plantas cada uno, hasta contabilizar una media de 140 plantas por parcela. El material

vegetal utilizado fueron plantas frescas del cultivar "Oso Grande", obtenidas de viveros de altura (Valladolid). El estado sanitario se testó como se indica en el apartado 3.5.2.2.

Todas las labores culturales fueron llevadas a cabo como se indica en el apartado 3.1.2.

Las plantas fueron lavadas e inoculadas artificialmente por inmersión en suspensión de conidias del aislado CT-2 (10^4 conidias/ml) durante tres minutos. Se llevaron a cámara frigorífica (2°C) durante siete días (Gubler et al., 1988).

Inmediatamente antes de la plantación se realizaron los tratamientos por inmersión de la planta en solución de fungicidas durante 30 minutos. Las materias ensayadas fueron: Hexaconazol (20 ppm), Propiconazol (100 ppm), Tiabendazol (200 ppm), Imazalil (100 ppm), Carbendazima (200 ppm), Bitertanol (100 ppm) y "Terlaí" (100 ppm). Se efectuó un tratamiento con hipoclorito sódico al 20%, disponiéndose dos testigos uno inoculado y otro sin inocular (Gubler et al., 1988).

Al mes de la siembra se iniciaron las aplicaciones de los fungicidas por pulverización, realizándose estos tratamientos quincenalmente hasta floración.

De cada subparcela se tomó un 10% de las plantas como unidad de muestreo, sobre las que se realizaron observaciones y recogida semanal de frutos. Las plantas muertas fueron retiradas, realizándose aislamientos de tejidos, tal como se describe en el apartado 3.3.3, para confirmar la presencia del patógeno.

La eficacia de los fungicidas se determinó según el porcentaje de plantas muertas por tratamiento, así como por la incidencia de podredumbre de fruto u otros síntomas. Estos datos se completaron con los de producción (peso medio en gramos por planta) para cada uno de los tratamientos. Al finalizar cada campaña se realizaron aislamientos de tejidos a las plantas consideradas unidades de muestreo, para determinar la existencia de infecciones latentes.

3.6.2.- UTILIZACIÓN DE CULTIVARES RESISTENTES

Se analizó la respuesta de 24 cultivares de fresa (diez de ellos no comerciales) al aislado CT-2, presente en la zona de cultivo de Huelva.

El material vegetal procedía de cultivo de meristemo y fue suministrado por el equipo del Dr. D. Fernando Pliego (Málaga). Las plantas se mantuvieron durante cuatro semanas en invernadero para observar la presencia de síntomas de antracnosis. Pasado este tiempo se trasladaron a cámara de cultivo de plantas para su aclimatación a las condiciones en que se iba a desarrollar el ensayo. En la cámara se mantuvo una HR del 75%, fotoperíodo de 16 h. luz y temperatura de 25°C. Antes de la inoculación se retiraron los peciolo viejos manteniendo tres hojas por planta.

Del aislado CT-2 se obtuvo un inóculo sobre PDA-Y de 7 días de edad. Mediante el raspado de las colonias y posterior filtrado mediante gasa se consiguió una suspensión de conidias de concentración 10^4 conidias/ml. La inoculación se realizó mediante inmersión de las plantas durante 3 minutos en la suspensión de conidias, previamente desinfectadas en solución de hipoclorito sódico 2% (2 min) y lavadas con agua esterilizada. Tras la inoculación las plantas se mantuvieron durante 48 h. a 100% HR, 25°C y 16 h. luz (Delp y Milholland, 1980 b y Smith y Spiers, 1982). El número de plantas inoculadas por cultivar fue de diez, manteniéndose otras tantas no inoculadas como control.

Transcurridos 30 días, período durante el cual se realizaron observaciones para determinar la aparición de síntomas, se efectuaron a todas las plantas aislamientos de tejidos sobre PDA-Y. Los resultados se expresan como porcentaje de plantas muertas, indicándose el índice de severidad según la escala de Delp y Milholland (1980 b) modificada en el apartado 3.2.7.-

3.6.3.- CONTROL TÉRMICO

Se analiza el potencial de los tratamientos por inmersión de plantas en baños de agua caliente en pre-siembra, para el control de la antracnosis en su fase de

podredumbre de corona.

3.6.3.1.- Resistencia térmica del patógeno "in vitro"

Mediante la combinación de tiempos de inmersión y temperaturas, se intentó determinar aquella que fuera letal para el hongo.

A partir del cultivo de CT-2 crecido durante 7 días a 25°C y luz continua se obtuvo una suspensión de conidias (10^2 conidias/ml) en agar-agua (1%). De esta suspensión se trasladan 0,5 ml a tubos de ensayo conteniendo 15 ml de agar-agua (1%). Se deja crecer el hongo durante 48 h., en las condiciones anteriormente descritas; procediéndose seguidamente a aplicar los tratamientos térmicos en baño termostatzado a las siguientes temperaturas: 40, 45, 50 y 55°C; siendo los tiempos de inmersión de 5, 7,5 y 10 minutos, en cada caso. A continuación, muestras de 0,1 ml se siembran en placas Petri, conteniendo PDA-Y, realizándose el conteo de las colonias desarrolladas tras 24 y 48 h. de crecimiento en luz continua a 25°C. Se dispuso de un control al que no se aplicó tratamiento, manteniéndose a temperatura ambiente, así como de cuatro repeticiones por combinación (Miller y Stoddard, 1956). Los resultados se expresan como media del porcentaje de inhibición.

3.6.3.2.- Experiencias de control térmico en ambiente controlado

El material vegetal utilizado consistió en plantas de fresa del cultivar "Oso Grande", que provenían de viveros de altura (Valladolid). Las plantas fueron inoculadas con el aislado CT-2 como se indica en el apartado 3.1.1, a concentración de 10^6 conidias/ml obtenida mediante ajuste y posterior conteo con cámara de Thoma.

Una vez inoculadas se mantuvieron durante 48 h. a temperatura ambiente para facilitar la instalación del inóculo. Pasado este tiempo se aplicaron mediante inmersión en baño termostatzado los tratamientos térmicos a temperaturas de 40 y 50°C, durante 5 y 10 minutos, plantándose a continuación en macetas de 20 x 20 cm, y llevándose a invernadero. Se dispusieron 5 repeticiones por combinación de tiempo y temperatura, repitiéndose la experiencia dos veces. Los controles consistieron en plantas no inoculadas y no tratadas, plantas no inoculadas y tratadas, así como plantas



inoculadas y no tratadas. Los resultados se expresan como porcentaje de plantas muertas y producción.

3.6.4.- CONTROL BIOLÓGICO

Habiéndose observado durante el primer año de experiencias en campo una incidencia de ACR inferior a la esperada, se consideró como posible causa la presencia de un hongo del género *Fusarium* spp. tanto en los tejidos internos de las plantas de fresa, como en el entorno de la corona, que se había detectado en los muestreos previos a la plantación y en los aislamientos realizados al final de las campañas.

3.6.4.1.- Estudio del potencial inhibitorio "in vitro"

La capacidad de inhibición del agente se determinó mediante enfrentamiento de las colonias de dicho organismo y de CT-2, utilizando como medio de cultivo PDA-Y. Se calculó el porcentaje de reducción del crecimiento hifal, tras medidas diarias del diámetro de ambas colonias y por comparación con los controles no enfrentados (Bankole y Adenbajo, 1996).

3.6.4.2.- Análisis de la posible patogenicidad de *Fusarium* sp frente a plantas de fresa. Influencia sobre el desarrollo de la enfermedad en condiciones controladas

La patogenicidad de *Fusarium* spp. se testó sobre plantas de fresa del cultivar "Chandler", la inoculación se llevó a cabo tanto sobre planta de fresa como sobre frutos. En el primer caso se realizó mediante inmersión de la planta en suspensión de conidias (concentración de 10^4 conidias/ml), manteniéndose las plantas inoculadas durante 48 h a 25°C y 100% HR, transcurrido este tiempo se trasladaron a invernadero para su observación. Los resultados se expresan como porcentaje de plantas muertas. En el caso de frutos, la inoculación se llevó a cabo mediante disco de micelio, como se indica en el apartado 3.1.1.3.

Para determinar la influencia del agente en el desarrollo de la enfermedad se llevaron a cabo inoculaciones conjuntas, sobre el cultivar "Chandler". Primero se

realizó inoculación por inmersión en suspensión de conidias de CT-2 (concentración 10^4 conidias/ml) de un grupo de plantas seguida a las 48 h de una re-inoculación con conidias de *Fusarium* spp. (concentración 10^4 conidias/ml). De igual forma se hizo a la inversa. Los controles consistieron en plantas no inoculadas, plantas inoculadas con CT-2 y plantas inoculadas con *Fusarium* spp.. Los resultados se expresan como porcentaje de plantas muertas. La experiencia se repitió dos veces, siendo de diez el número de repeticiones.

3.6.4.3.- Fungotoxicidad "in vitro"

Se ensayó la eficacia en el control del posible antagonista de los fungicidas ensayados en campo para determinar su influencia en los resultados obtenidos. La metodología seguida se detalla en el apartado 3.6.1.1.

3.6.4.4.- Influencia en campo

Durante los tres años de experiencia se observa la presencia/ausencia de *Fusarium* spp. en el entorno radicular en muestras de las plantas utilizadas en campo (apartado 3.5.2.2), así como en los aislamientos de tejido realizados tanto en pre-siembra, como al final de cada campaña. Los resultados se expresan como porcentaje de plantas de las que se aisló dicho hongo sobre el total.

3.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico se ha realizado mediante análisis de varianza con una o dos fuentes de variación y multifactoriales. La significación de los valores de la prueba F se ha expresado de la siguiente forma: no significativo (NS), significativo al 95% y significativo al 99%. En los casos en que el valor de F resultó significativo, el análisis de varianza se completó con el cálculo de la mínima diferencia significativa (MDS, $p = 0,05$ / $p = 0,01$).

Los datos expresados como porcentajes se sometieron previamente a una transformación angular, cuando existen valores iguales a cero la transformación utilizada fue la raíz cuadrada y la logarítmica para números enteros que cubren un amplio intervalo (Steel y Torrie, 1985).

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- DESCRIPCIÓN DE SÍNTOMAS

4.1.1.- DESARROLLO DE LOS SÍNTOMAS EN AMBIENTE CONTROLADO

4.1.1.1.- Podredumbre de corona

A los ocho días de la inoculación comienzan a aparecer síntomas de ACR, caracterizados por la muerte de la yema, que presentaba una coloración amarillenta, afectando al 28% de las plantas. El resto comienza a emitir el primer par de hojas, las cuales, cuatro días después murieron en el 33% de las plantas. Posteriormente, entre 15 y 17 días, de la plantación, se observó que todas presentaban síntomas de ACR, decaimiento general y muerte de la planta habiendo emitido sólo un par de hojas.

En cuanto al desarrollo de las necrosis en los tejidos internos de la corona, indicar que en la primera extracción, cinco días después de la inoculación, no se observó ningún síntoma, aislándose el patógeno en el 20% de las plantas. Howard y Albregts (1984 b), indican que la infección en su estado inicial no se detecta visualmente, debido a que aún no se han desarrollado en los tejidos las necrosis de color rojizo.

En los cortes longitudinales practicados a las plantas analizadas diez días después de la inoculación se detectaron necrosis secas de color marrón-rojiza en un 60% de las muestras, tal y como las describen otros autores (Brooks, 1935; Horn y Carver, 1963; Delp y Milholland, 1980 b; Howard et al., 1992 y Denoyés-Rothan et al., 1996). La zona afectada ocupa entre el 5 y el 30% de la superficie total de la corona; observándose que un mayor desarrollo de las necrosis corresponde, en todos los casos a la penetración del hongo desde la yema. En el 70% de los casos la infección se inició desde el punto de inserción del estolón.

Dos semanas después de iniciada la experiencia todas las plantas presentaron síntomas de ACR, caracterizado por tejidos necrosados de color marrón rojizo, ocupando el 100% de la corona, reaislándose el patógeno de dicha zona; resultados que se repiten en la cuarta extracción.

Cuando los aislamientos se realizan entre 10 y 15 días después de la muerte de las plantas, sobre tejidos de corona totalmente necrosados, es difícil recuperar el patógeno. En el primer caso se aisló del 80% de las plantas, mientras que en el segundo sólo se obtiene en el 20%; no detectándose ningún otro organismo. Según Howard et al. (1992), a partir de la segunda o tercera semana después de la muerte de la planta no se suele recuperar el patógeno, en el caso de ACR originada por *C. fragariae* o *G. cingulata*.

4.1.1.2.- Síntomas en estolones y peciolos

Cuando se realizan las inoculaciones mediante pulverización de suspensión de conidias no se reproducen los síntomas de la enfermedad sobre estolones, peciolos u hojas.

En el caso de inoculación mediante inyección se comienzan a observar síntomas a las 72 horas. Las manchas, sobre estolones y peciolos, son hundidas presentan un color púrpura y una longitud media de 2,5 mm. A lo largo del tiempo continúan elongándose, para alcanzar a los treinta días de la inoculación un tamaño de 120 mm en el caso de los estolones y llegando a estrangular a los peciolos. El patógeno es recuperado del borde de las lesiones.

Delp y Milholland (1980 b) y Smith y Spiers (1982) utilizan la técnica de inoculación mediante pulverización para determinar la resistencia de cultivares de fresa a *C. fragariae*, resultando dicha técnica exitosa en la reproducción de los síntomas. Sin embargo, cuando se estudia la patogenicidad de *C. acutatum*, se observa que dicho patógeno no provoca síntomas en hoja ni en peciolos cuando la inoculación se realiza por pulverización; mientras que sólo se reproducen con algunos aislados de dicha especie cuando la inoculación se realiza con herida, coincidiendo con lo descrito por Smith y Spiers (1982), lo que explicaría, si se tratara de dicho patógeno los resultados obtenidos.

4.1.1.3.- Podredumbre de fruto

Los primeros síntomas, en frutos maduros, aparecen a las 24 horas de la

inoculación, observándose una ligera depresión bajo el disco de micelio. Pasados tres días se aprecia esporulación del hongo sobre la mancha circular y deprimida, la cual presenta un diámetro de 10 mm. A los cinco días todos los frutos inoculados presentaban síntomas similares a los observados en campo, excepto por el aumento de micelio aéreo, lo que se corresponde con lo obtenido por Howard y Albregts (1984). A partir del sexto día comienzan a desarrollarse en el borde de las lesiones otros patógenos como *Rhizopus* spp. o *Botrytis* spp..

En el caso de los frutos verdes los síntomas no se detectan hasta las 48 h, cuando ya han comenzado a madurar, presentando entonces manchas secas y oscuras cubiertas por una masa de conidias anaranjadas. A los cinco días las manchas alcanzaron un diámetro de 5 mm.

Los resultados son idénticos para los tres cultivares utilizados. Sobre los frutos control no se desarrollaron síntomas de podredumbre de fruto, aunque entre cuatro y cinco días después del inicio de la experiencia se detectaron *Rhizopus* spp. y *Botrytis* spp..

4.1.2.- EXPERIENCIAS EN CAMPO

4.1.2.1.- Caracterización de síntomas

Los primeros síntomas de ACR se manifestaron siete días después de la plantación, cuando las plantas sanas presentaban de dos a tres hojas. Las que habían muerto comenzaron mostrando la yema marchita, no emitiendo hojas verdaderas. Cuando se realizan cortes longitudinales de la corona se aprecia una decoloración marrón-rojiza seca que llega a ocupar la totalidad de su superficie. Esta descripción coincide con la realizada por Brooks (1935), así como por otros autores con posterioridad (Horn y Carver, 1963; Delp y Milholland, 1980 b; Howard et al., 1992; Denoyés-Rothan et al., 1996). Según Horn y Carver (1963) el punto de penetración del hongo se encuentra a nivel de suelo, mientras que las observaciones realizadas indican que el hongo penetra por el punto de inserción del estolón o bien por la yema (Delp y Milholland, 1980 b; Denoyés-Rothan et al., 1996) (Figura 2). En algunas

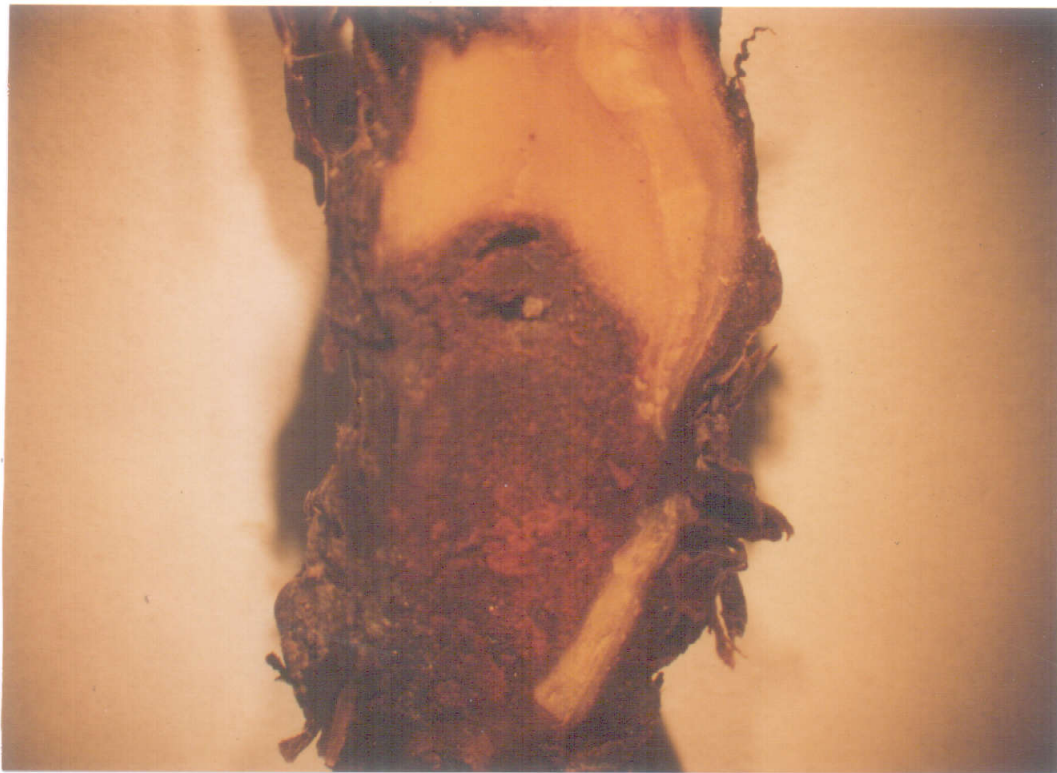
ocasiones los tejidos de la corona son asintomáticos, aislándose el patógeno de los mismos.

Los síntomas de ACR en plantas que ya han comenzado la fructificación, se caracterizaron por el decaimiento de las mismas comenzando por la yema y progresando hacia fuera, coincidiendo con lo descrito por Plakidas (1964). En ocasiones, si la planta presenta múltiples coronas, puede ocurrir que una de ellas muera mientras el resto permanece sana (Figura 3).

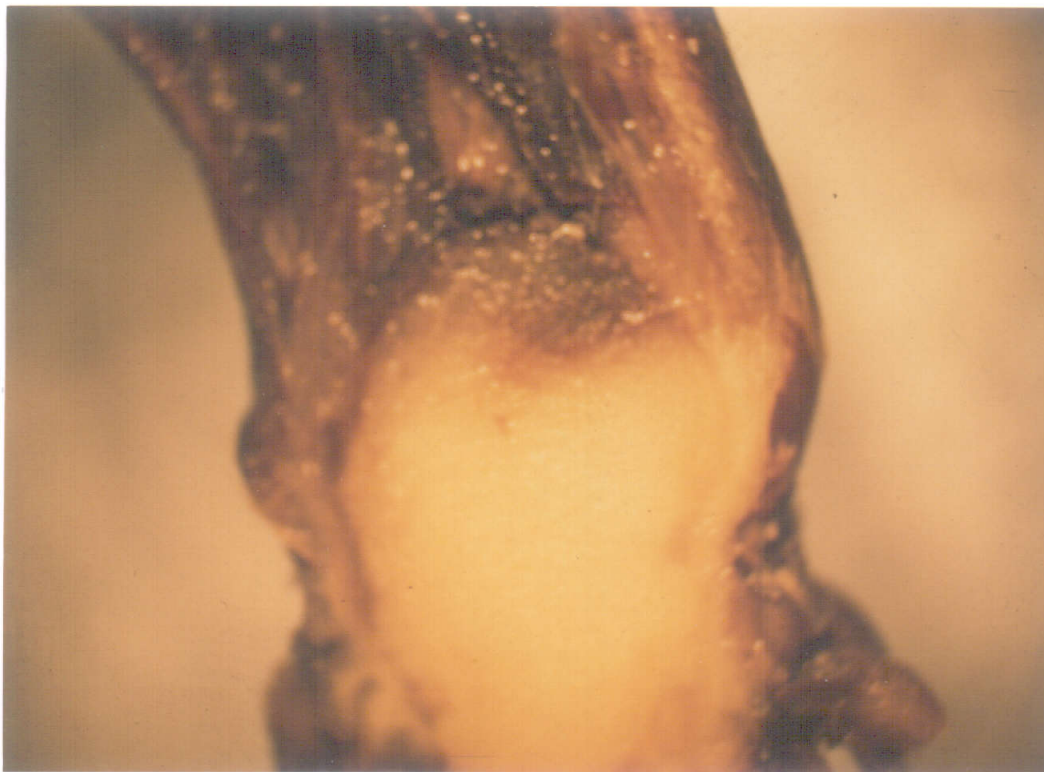
Es frecuente aislar el patógeno de los tejidos radiculares de plantas muertas. En estos casos las raíces presentan el cortex de color negro, mientras que el tejido vascular permanece sano. Ninguno de los autores revisados describe la presencia de patógenos del género *Colletotrichum* afectando este tipo de tejido.

Durante los tres años de experiencias en campo se observa como las primeras podredumbres de frutos maduros aparecen en Febrero, manteniéndose su presencia, con mayor o menor incidencia, durante todo el período de cosecha. Las lesiones aparecen como manchas hundidas, firmes y circulares. En principio no son perceptibles por observación directa, comienzan a tomar una coloración marrón clara, que con el tiempo se oscurecen y aumentan de tamaño. Sobre las manchas se aprecia una coloración anaranjada que corresponde a la esporulación del hongo. Los aquenios en la zona afectada se tornan de color negro. La infección se inicia en cualquier punto del fruto, apareciendo frecuentemente más de una mancha, las cuales pueden crecer hasta afectar al fruto en su totalidad, provocando que finalmente se sequen y momifiquen, tomando una apariencia acorchada. Estos síntomas coinciden con los descritos por: Sturgess (1954); Wright et al. (1960); Howard (1972); McGechan (1977); Maas (1978) y Denoyés-Rothan et al. (1996) (Figuras 4 y 5).

La presencia de podredumbres en frutos verdes ha sido esporádica en los dos primeros años en que se han realizado las observaciones, siendo más frecuentes durante el tercero. Las lesiones son oscuras y duras, presentando esporulación anaranjada (Howard et al., 1992) (Figura 6).



a)



b)

Figura 2.- Coronas necrosadas en corte longitudinal mostrando síntomas de ACR.

a.- Necrosis comenzando por punto inserción estolón.

b.- Necrosis comenzando por yema



Figura 3.- Parte aérea de la planta mostrando síntomas severos de ACR.



Figura 4.- Fruto maduro mostrando síntomas de antracnosis en campo.



Figura 5.- Fruto maduro que presenta amplia superficie afectada con achenios necrosados.

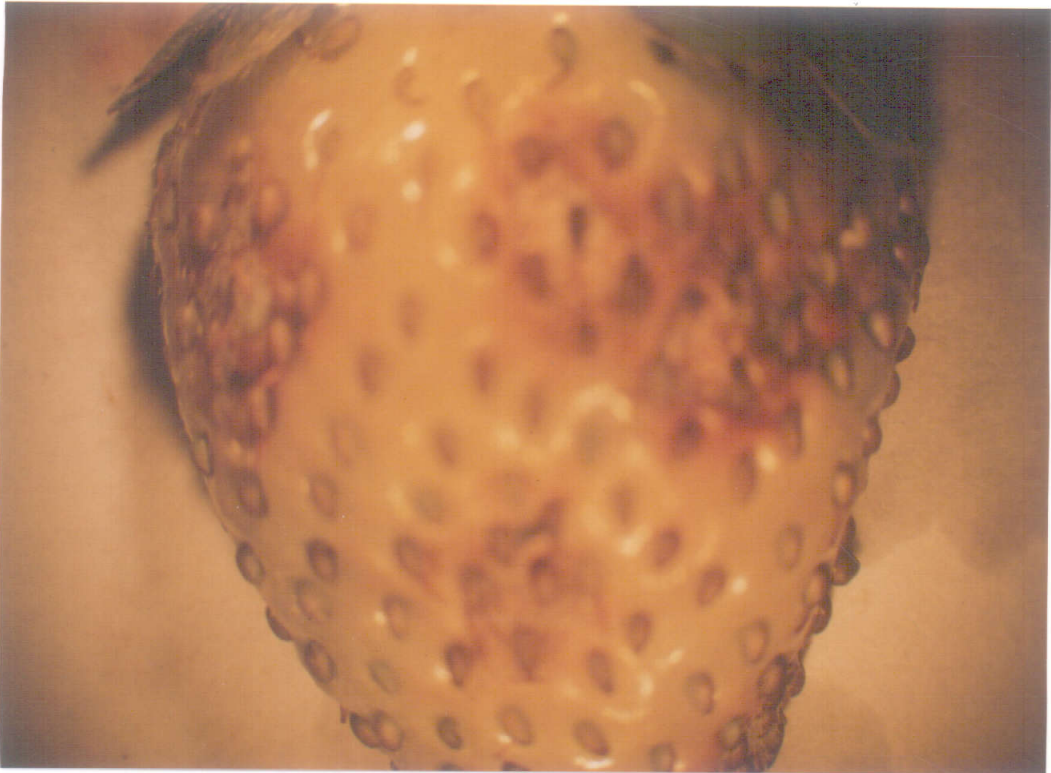


Figura 6.- Fruto inmaduro mostrando síntomas de antracnosis.

No se han detectado síntomas en estolones ni en peciolo. Durante el último año si se observaron síntomas en flores, las cuales presentaban pérdidas de pétalos, así como pistilos y óvulos de color oscuro (Figura 7); ocasionalmente el cáliz y la porción superior del pedúnculo aparecían de color marrón claro. Dicha sintomatología pudo ser debida a que la infección se produjo cuando la flor estaba abierta tal como describen Howard y colaboradores (1992).

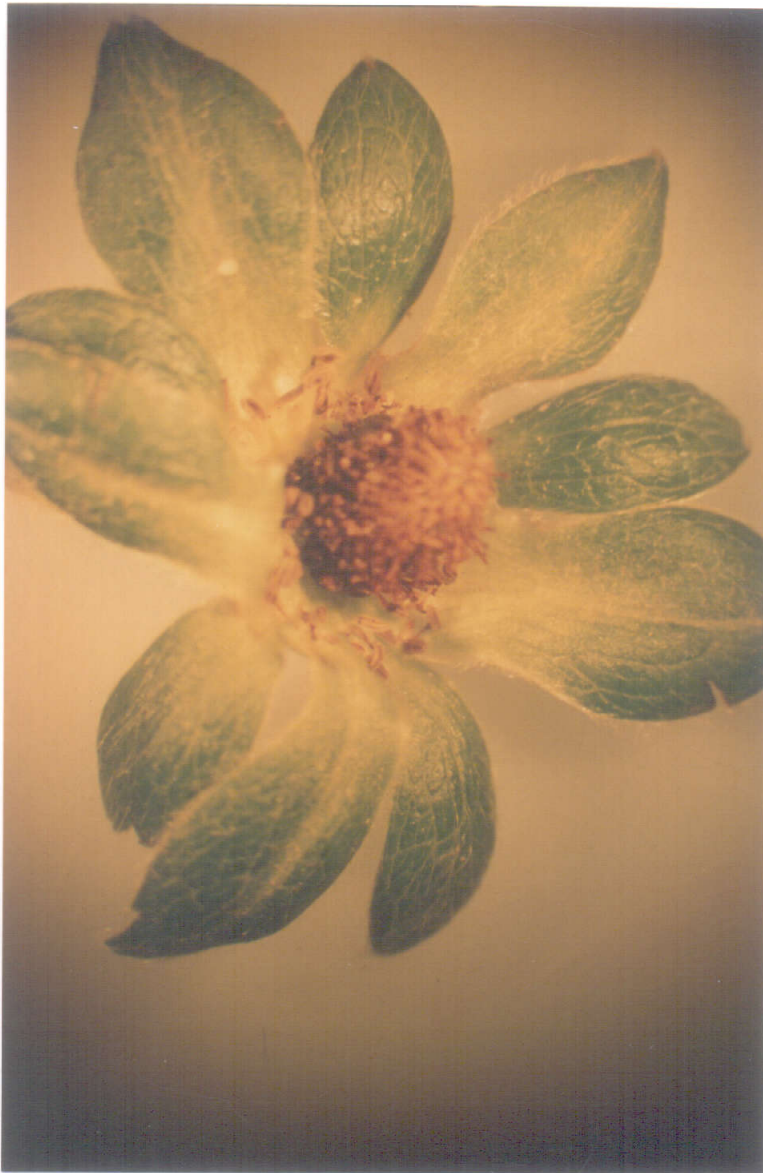


Figura 7.- Marchitamiento de la flor ocasionado por *Colletotrichum* spp..

En la primavera de 1996, se detectaron plantas que presentaban lesiones en hojas de entre 5 y 10 mm de diámetro, de color marrón-claro y borde rojizo de las que se aisló el patógeno. Esta sintomatología no se corresponde con ninguna de las descritas anteriormente por Howard y colaboradores (1983 y 1991) como originadas por hongos del género *Colletotrichum* (Figura 8).

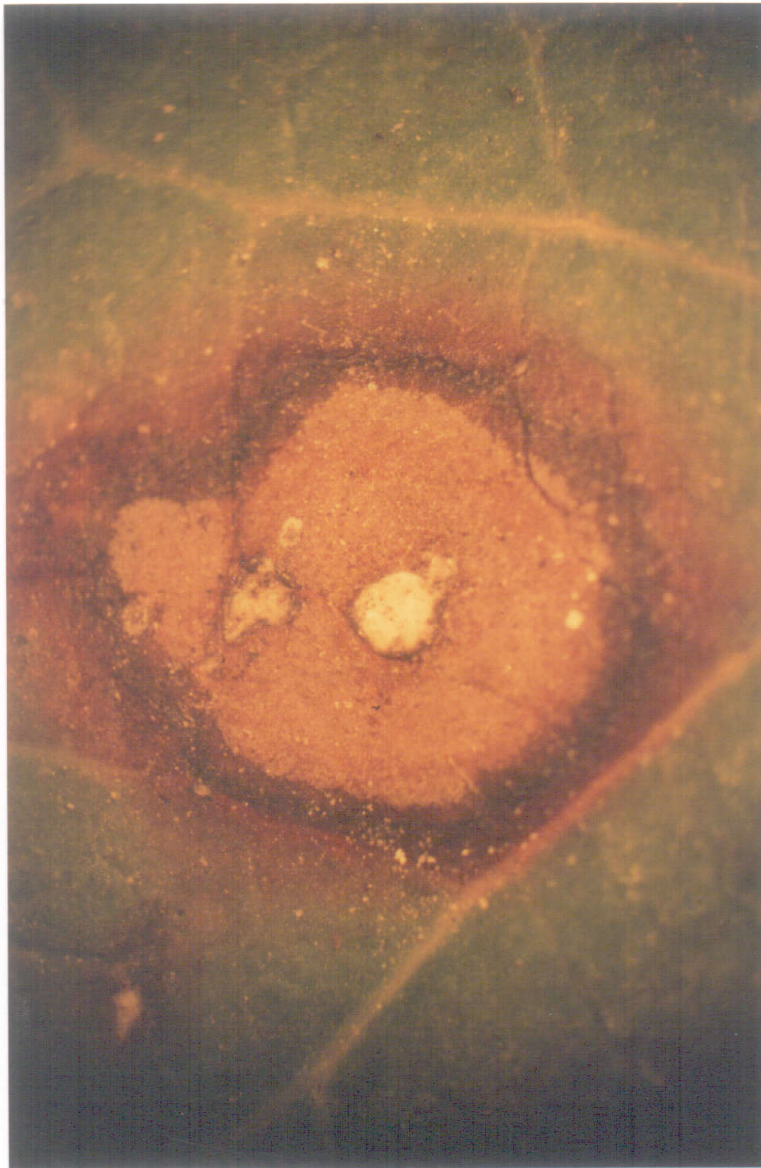


Figura 8.- Mancha necrótica en hoja de fresa originada por *Colletotrichum* spp.

4.2.- IDENTIFICACIÓN DEL AISLADO

4.2.1.- Características conidiales

Las conidias son mayoritariamente cilíndricas en los aislados identificados en origen como *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*, aunque se observan algunas con un extremo puntiagudo; mientras que en el caso de los tipo "acutatum" aparecen conidias de los tres tipos, presentando la mayoría uno o los dos extremos en punta, excepto en el caso de los aislados 324995 y 348499 en los que aparece un número elevado de conidias cilíndricas (Tabla 6). Según las descripciones originales los hongos de la especie *C. acutatum* presentan las conidias de tipo fusiforme (Simmonds, 1965), mientras que las conidias de *C. fragariae* serían cilíndricas (Brooks, 1931) y las de *C. gloeosporioides* cilíndricas con uno de los extremos agudos (Sutton, 1992). Estudios posteriores muestran como las conidias de *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* no presentan ambos extremos en punta y que las conidias de *C. acutatum* pueden presentar los tres tipos, aunque serían mayoritariamente fusiformes (Smith y Black, 1990 b y Denoyés-Rothan y Baudry, 1995).

El tamaño de las conidias no puede ser considerado un carácter diferencial ya que, como se observa en la Tabla 6, los valores obtenidos en las distintas especies son solapantes, siendo, en general, ligeramente menores en los aislados tipo "acutatum". La mayoría de los autores llegan a resultados similares (Simmonds, 1965; Brooks, 1931; Howard y Albrechts, 1983; Sutton, 1992 y Smith y Black, 1990 b). Denoyés-Rothan y Baudry (1995), indican que este no puede ser considerado un carácter diferencial, no así la forma de las conidias.

En cuanto al color de las conidias en masa, como ya indicaron Smith y Black (1990 b), varía del rosa al anaranjado; excepto en el caso de *C. miyabeana* (345581), donde no se observó formación de conidias.

4.2.2.- Producción del estado ascal

Sólo dos aislados (Tabla 6) producen ascas con ascosporas típicas de *G. cingulata* (forma perfecta de *C. gloeosporioides*), siendo precisamente aquellos

identificados en origen como dicha forma imperfecta. El aislado número 345051, identificado como tal, no produce dicha estructura. El aislado obtenido en la provincia de Huelva, al igual que el resto, no produce ascas en las condiciones marcadas; por lo que ninguno de ellos puede considerarse como perteneciente a dicha especie (Denoyés-Rothan y Baudry, 1995; Smith y Black, 1990 b).

4.2.3.- Características de los apresorios

El tamaño y la forma de los apresorios se caracterizaron en base a los originados por las conidias en germinación, ya que no se apreció su formación en hifas. Algunos de los aislados no produjeron, en las condiciones marcadas, estas estructuras.

El tamaño medio de los apresorios es ligeramente inferior al descrito por Dyko y Mordue (1979). En la tabla 6 se observa que son ligeramente mayores en el caso de los aislados *C. gloeosporioides* n° 345051 (7,73 x 5,31 μm) y *C. fragariae* n° 348172 (8,62 x 4,96 μm), no apreciándose en el resto diferencias significativas.

Se detectan dos tipos de apresorios: T1 de color marrón, ovoide y lobulado y T2 de color gris oscuro a marrón claro, ovoides no lobulados. El tipo de apresorio es solapante entre las tres especies, aunque en los aislados identificados como *C. acutatum* el segundo es el más habitual. El aislado número 348499, identificado como tipo "acutatum", en origen presentó la mayoría de sus conidias cilíndricas y apresorios T1. Algunos autores no consideran este carácter esencial para la diferenciación entre las especies (Simmonds, 1965 y Smith y Black, 1990 b) (Tabla 6).

4.2.4.- Producción de quetas

Sobre agar-hoja de fresa sólo se apreció formación de quetas en acervulos en dos de los aislados (números I.M.I. 324984 y 324988), presentando características similares: no septadas, extremos puntiagudos, hialinas más oscuras en la base, con un tamaño de 64 - 170 x 3 - 4,25 μm . Dichos aislados se consideran *C. gloeosporioides* coincidiendo las características de las quetas con las descritas por otros autores, exceptuando el número de septos ya que en este caso no se observan, mientras que se

AISLADO	FORMA DE CONIDIAS ^x			TAMAÑO CONIDIAS ^y	ESTADO ASCAL ^z	APRESORIOS
	CIL	INT	FUS			TAMAÑO ^w / TIPO
<i>C. gloeosporioides</i>						
324984	85,34	14,11	0,56 ^a	16,15 x 4,25 ^d	+	no produce
324988	23,81	76,19	0 ^a	15,30 x 4,04 ^d	+	no produce
345051	75,66	24,34	0 ^a	11,90 x 4,25 ^{a,b,c}	-	7,73 x 5,31 ^b / T1
<i>C. miyabeana</i>						
345581	(-)	(-)	(-)	-	-	no produce
<i>C. acutatum</i>						
324993	23,09	13,94	62,97 ^d	10,20 x 4,25 ^{a,b}	-	5,84 x 4,25 ^a / T2
324995	30,77	69,23	0 ^a	10,63 x 3,83 ^{a,b}	-	6,11 x 4,25 ^{a,b} / T2
345026	18,21	45,65	36,15 ^c	13,18 x 4,25 ^{b,c,d}	-	no produce
345029	14,86	41,79	43,36 ^c	14,88 x 4,45 ^{c,d}	-	6,52 x 4,04 ^{a,b} / T2
348499	51,04	24,54	24,42 ^b	10,46 x 4,25 ^{a,b}	-	6,55 x 4,31 ^{a,b} / T1
360086	17,65	41,17	41,18 ^c	10,52 x 3,51 ^{a,b}	-	no produce
367467	0	33,23	66,77 ^d	14,24 x 4,25 ^{c,d}	-	6,32 ^{a,b} x 4,25 / T2
364856	8,26	62,82	28,92 ^{b,c}	10,23 x 4,32 ^{a,b}	-	escasos / T2
<i>C. fragariae</i>						
348152	81,65	18,35	0 ^a	14,45 x 4,25 ^{c,d}	-	6,97 x 4,72 ^{a,b} / T2
348167	33,00	67,00	0 ^a	14,15 x 4,32 ^{c,d}	-	no produce
348172	28,50	71,50	0 ^a	13,95 x 4,53 ^{c,d}	-	8,62 x 4,96 ^b / T1
CT-2	35,15	35,22	29,64 ^{b,c}	13,18 x 4,25 ^{b,c,d}	-	7,32 x 5,20 ^{a,b} / T2

TABLA 6.- Características morfológicas de los aislados.

^x Forma de las conidias: CIL = cilíndricas con ambos extremos redondeados; INT = intermedia con un extremo redondeado y otro en punta; FUS = fusiforme, ambos extremos puntiagudos. Expresado como porcentaje. Mínima Diferencia Significativa, entre porcentaje de conidias fusiformes MDS (0,01) = 9,77

^y Media de 100 conidias (μ m). Mínima Diferencia Significativa entre longitudes MDS (0,01) = 2,87

^z Presencia (+) o ausencia (-) de peritecios, sobre PDA-Y y OMA.

^w Tamaño medio de 25 apresorios (μ m). MDS (0,05) = 1,82 (considerando el diámetro mayor).

describen como septadas al menos una vez por Dyko y Mordue (1979) y Gubler y Gunnell (1991).

El aislado obtenido en la provincia de Huelva forma, en las condiciones de cultivo descritas, acérvulos, sin quetas. Esta estructura se detectó sobre frutos sintomáticos, presentando color marrón oscuro, con paredes delgadas, septadas, ligeramente curvadas y con un tamaño medio de 54 x 4 μm .

Según Gubler y Gunnell (1991), la utilización de este medio de cultivo favorece la formación de quetas en los acervulos, sea cual sea la especie de *Colletotrichum*, considerando la forma, tamaño y color de las quetas como parámetros válidos en la diferenciación de las especies del género. Sin embargo, tras repetir la experiencia en varias ocasiones sólo se han reproducido en el caso de hongos pertenecientes a la especie *C. gloeosporioides*.

Según Sutton (1992), la formación de estas estructuras depende de las condiciones ambientales, existiendo algunos aislados del género que no las producen. Smith y Black (1990 b), indican que tanto en cultivo (PDA o PDA + OMA) como en condiciones naturales sólo forman quetas algunos de los aislados de esta especie, no observándose en *C. gloeosporioides* ni en *C. acutatum*. Otros autores indican que este último sólo forma quetas en condiciones naturales (Simmonds, 1965 y Dyko y Mordue, 1979).

4.2.5.- Características culturales y respuesta a la temperatura en PDA-Y

La tabla 7 muestra las características culturales de los aislados considerados. El color de las colonias de los aislados identificados como *C. gloeosporioides* varía de gris a verde oliva. Entre los *C. fragariae* existen variaciones, pero en ambos casos el reverso de las colonias presentaba una coloración gris o verde. Los aislados tipo *C. acutatum* muestran coloraciones rosadas o anaranjadas, recubriéndose de un velo gris o blanco con el paso del tiempo, siendo generalmente el reverso de la colonia de color rosa o anaranjado, con algunas excepciones. El aislado obtenido de fresa en la provincia de Huelva coincide en color con aquellos encuadrados como *C. acutatum*. Según Smith y Black (1990 b), el color rosado o anaranjado de las colonias es

AISLADO	COLOR COLONIA	DIÁMETRO ^x	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ^y
<i>C. gloeosporioides</i>			
324984	gris, verde	75,50 ^e	R 0,462 ^e
324988	blanco, gris	72,00 ^e	R 0,447 ^{d,e}
345051	gris, verde	72,75 ^e	R 0,430 ^d
<i>C. miyabeana</i>			
345581	verde oscuro	44,75 ^b	L 0,268 ^a
<i>C. acutatum</i>			
324993	gris, rosa	50,00 ^c	M 0,315 ^c
324995	blanco	30,25 ^a	L 0,203
345026	beige, verde	27,25 ^a	L 0,166
345029	rosa, anaranjado	45,25 ^b	L 0,280 ^{a,b}
348499	gris, rosa	47,25 ^{b,c}	M 0,295 ^{b,c}
360086	gris, beige	23,25	L 0,144
367467	rosa	47,50 ^b	L 0,293 ^b
364856	gris, verde	45,75 ^{b,c}	L 0,281 ^{a,b}
<i>C. fragariae</i>			
348152	blanco, rosa	64,25 ^d	M 0,397 ^c
348167	beige	61,75 ^d	M 0,401 ^c
348172	gris claro	71,75 ^c	R 0,435 ^d
CT-2	gris, rosa	45,25 ^b	L 0,280 ^{a,b}

TABLA 7.- Características culturales de los aislados.

^x Diámetro medio de las colonias (mm). MDS (0,05) = 4,088

^y Velocidad de crecimiento (mm / 24 h). MDS (0,05) = 0,021. R rápida; M media; L lenta

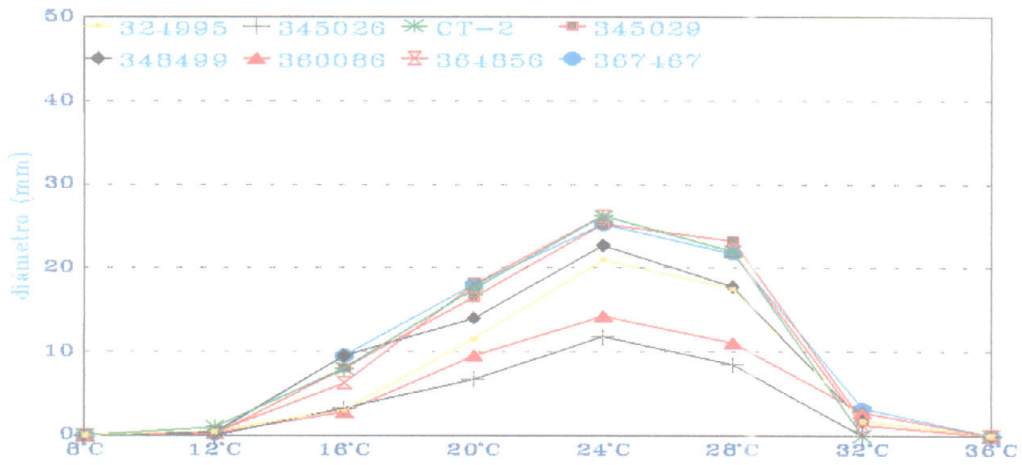
indicativo de esta última especie, aunque en ocasiones aparecen aislados de *C. fragariae* con esta característica, o aislados de *C. acutatum* sin ella.

Se observan diferencias significativas en el crecimiento de los aislados. Los *C. acutatum* y *C. miyabeana* presentan los valores más bajos, siendo superiores en los aislados *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*. Según distintos autores los aislados de crecimiento rápido corresponderían con las últimas especies citadas, mientras que los de crecimiento lento serían *C. acutatum* (Smith y Black, 1990 b; Denoyés-Rothan y Baudry, 1995). El aislado CT-2 presenta una baja velocidad de crecimiento y un diámetro que no difiere significativamente de aquellos considerados *C. acutatum*.

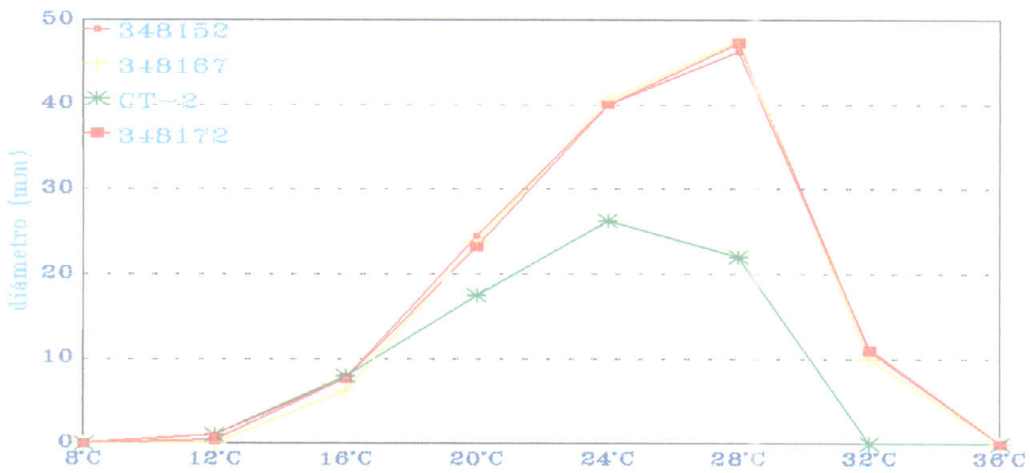
La figura 9 muestra el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de cada uno de los aislados considerados. En los tipo "acutatum" y "miyabeana" la temperatura óptima es de 24°C, siendo de 28°C para el resto. A 24°C, el aislado obtenido en la provincia de Huelva no difiere significativamente ($MDS(0,05) = 3,38$) de la mayoría de los considerados "acutatum". En general los aislados de este tipo presentan una tasa de crecimiento menor que los "gloeosporioides" o "fragariae" a cualquiera de las temperaturas ensayadas. Las temperaturas letales para los hongos de este género serían de 8°C o inferiores e iguales o superiores a 36°C, llegando en algunos casos a no observarse crecimiento a 12 o 32°C. Los resultados obtenidos por distintos autores indican rangos de temperaturas óptimas entre 25 y 30°C, considerando como letales temperaturas inferiores a 5°C y superiores a 35°C (Horn, 1963; Gullino et al, 1985; Wilson et al, 1990; Smith y Black, 1990 b y Denoyés - Rothan y Baudry, 1995).

Las variaciones en el crecimiento de los aislados según sea el medio de cultivo, se muestran en la tabla 8. El crecimiento en el medio AHF, rico en sustancias minerales, es inferior que en el resto para todos los aislados; presentando los diámetros máximos los aislados tipo "gloeosporioides" y "fragariae", siendo significativamente inferiores los de tipo "acutatum", esta es la tendencia que se aprecia en todos los medios de cultivo. El medio PDA presentó los mayores índices de crecimiento; junto al Agar V8, en cuya composición se incluye CO₃ Ca.

Aislados tipo "acutatum"



Aislados tipo "fragariae"



Aislados tipo "cingulata" y "miyabeana"

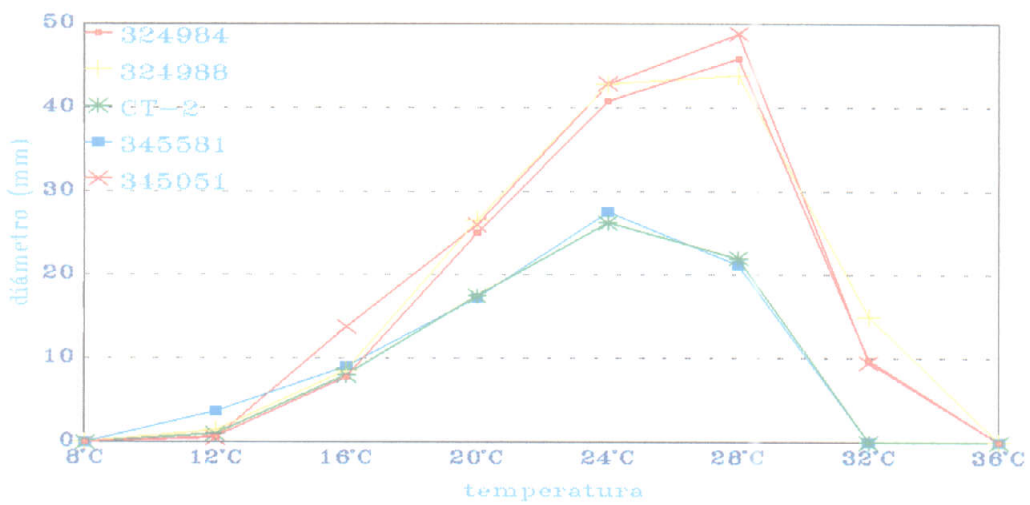


Figura 9.- Influencia de la temperatura en el crecimiento de los aislados.

AISLADO	AHF ^x	V - 8 ^y	OMA ^z	PDA ^w
<i>C. gloeosporioides</i>				
324984	49,00 ^a	73,00 ^d	63,67 ^g	76,63 ^d
324988	58,00	69,33 ^d	66,33 ^g	74,00 ^d
345051	53,00 ^b	73,00 ^d	67,00 ^g	78,00 ^d
<i>C. miyabeana</i>				
345581	45,67	52,33 ^{a, b, c}	49,00 ^{c, d}	54,33 ^c
<i>C. acutatum</i>				
324993	40,67 ^c	52,33 ^{a, b, c}	57,00 ^{e, f}	57,63 ^c
324995	38,67 ^{c, d}	47,33 ^a	45,63 ^{b, c}	40,67 ^{a, b}
345026	31,00 ^c	41,63	36,00 ^a	34,33 ^a
345029	31,00 ^c	55,63 ^c	54,00 ^{d, e}	55,63 ^c
348499	38,00 ^{c, d}	55,63 ^c	53,00 ^{d, e}	56,33 ^c
360086	29,00 ^c	34,63	25,63	41,00 ^b
367467	31,00 ^c	56,00 ^c	51,00 ^{c, d, e}	55,63 ^c
364856	37,33 ^d	50,00 ^{a, b}	41,63 ^{a, b}	54,33 ^c
<i>C. fragariae</i>				
348152	49,00 ^a	74,33 ^d	64,00 ^g	74,33 ^d
348167	49,00 ^a	66,33 ^d	57,00 ^{c, f}	72,33 ^d
348172	52,00 ^{a, b}	73,00 ^d	62,00 ^{f, g}	74,00 ^d
CT - 2	30,33 ^e	52,63 ^{b, c}	85,00	56,00 ^c

TABLE 8.- Crecimiento micelial de los aislados en distintos medios sólidos, tras 7 días de cultivo a 25°C.

^x AHF (Agar Hoja de Fresa). MDS (0,01) = 3,45.

^y V - 8 (Agar 8 Vegetales). MDS (0,01) = 5,73.

^z OMA (Agar Harina de Avena). MDS (0,01) = 7,31.

^w PDA (Patata Dextrosa Agar). MDS (0,01) = 7,09

4.2.6.- Variaciones patogénicas entre los aislados

Las tablas 9, 10, 11, 12 y 13 muestran los resultados de los test de patogenicidad ensayados sobre los cultivares "Oso Grande", "Chandler", "Camarosa", "Pájaro" y "Selva"; que fueron inoculados con los distintos aislados del género *Colletotrichum*; se observa como alguno de ellos, considerados originariamente patógenos de fresa, no provocan síntomas de antracnosis sobre alguno o todos los cultivares.

La respuesta de susceptibilidad a cada uno de los aislados es diferencial a excepción de aquellos que no inducen síntomas.

Al analizar la respuesta de los aislados identificados en origen como *C. acutatum* encontramos que sólo uno de ellos no induce la aparición de síntomas de ACR, aunque si ocasiona síntomas en fruto (nº I.M.I 345029). La media del conjunto de los aislados indica que la respuesta es intermedia en todos los cultivares. Cuatro de los aislados no provocaron síntomas en fruto, produciendo, en el conjunto, una respuesta de resistencia; dos de estos aislados no formaron apresorios en las condiciones estudiadas (I.M.I. 345026 y 360086) (Tablas 9 A y 9 B).

Entre los aislados considerados originariamente como incluidos en la especie *C. fragariae*, encontramos cuatro que no produjeron síntomas de ACR, originando al menos dos de ellos podredumbre de fruto (Tabla 10). Desde que Brooks en 1931 identificara al agente causal de antracnosis en fresa como perteneciente al género *Colletotrichum*, denominándolo *C. fragariae*, tuvieron que transcurrir casi 50 años para que esta especie dejase de ser considerada como única inductora de dicha enfermedad en fresa (Howard y Albregts, 1984). El hecho de que estos aislados, todos ellos provenientes de EEUU, no originen síntomas de ACR podría indicar o bien pérdida de patogenicidad, poco probable en aquellos que provocan síntomas en fruto, o que se pudieran considerar patotipos especializados en ocasionar enfermedad en esta parte de la planta. Esta asunción nos llevaría a tener que interpretar una variación en su ciclo biológico. Este mismo criterio puede ser utilizado en aquellos aislados de *C. acutatum* que no originan síntomas en fruto.

RESPUESTA DE CULTIVARES A LA ENFERMEDAD ^x							
Nº I.M.I.	OSO G.	CHANDLER	CAMAROSA	PÁJARO	SELVA	MEDIA DE CVS ^w	FR ^y
299103	1,10	3,60 (20) ^z	7,60 (80)	3,60 (20)	2,90 (20)	3,76	+
301119	1,00	2,63 (20)	1,00	1,00	1,00	1,13	+
311744	1,00	4,20 (40)	1,80	5,50 (60)	1,10	2,72	+
324992	2,40 (20)	2,50 (20)	2,50 (20)	1,00	2,40 (20)	2,16	+
324993	5,60 (20)	5,30 (20)	7,70 (80)	5,10 (40)	4,10 (40)	5,56	+
324994	6,60 (80)	4,00 (40)	8,20 (100)	6,70 (80)	8,40 (100)	6,78	+
324995	1,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,20	-
345026	2,50 (20)	1,00	1,00	1,00	2,50 (20)	1,60	-
345027	2,40 (20)	4,30 (40)	3,90 (40)	5,20 (60)	8,50 (100)	4,86	ND
345028	2,40 (20)	1,00	3,80 (40)	2,40 (20)	1,00	2,12	ND
345029	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	+
345031	1,00	1,80	2,40 (20)	2,00	1,00	1,64	+
345032	8,10 (100)	3,60 (20)	8,20 (100)	6,10 (60)	8,40 (100)	6,88	+
345033	3,90 (40)	2,40 (20)	4,20 (40)	2,60 (20)	4,30 (40)	3,00	ND
345034	1,00	1,70	2,10	1,70	1,10	1,52	+
345035	1,00	3,80 (40)	3,90 (40)	1,50	1,20	2,28	+
345053	1,00	1,00	3,80 (40)	1,00	1,00	1,56	+
345574	3,80 (40)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,56	-
345575	5,20 (60)	2,40 (20)	1,00	1,00	1,00	2,12	+
345576	8,10 (100)	4,10 (20)	6,40 (60)	7,10 (80)	7,10 (80)	6,56	+
345577	1,00	1,00	3,80 (40)	2,40 (40)	1,00	1,84	+
345583	3,90 (40)	6,90 (80)	8,50 (100)	8,50 (100)	6,30 (60)	6,82	+

TABLA 9 A .- Respuesta de cultivares de fresa a la inoculación con distintos aislados de *C. acutatum*.

^x Incidencia de ACR en distintos cultivares. Escala 1 - 8; 1 sin síntomas (no se aísla el patógeno), 8 planta muerta.

^y Presencia (+) / ausencia (-) de síntomas de antracnosis en fruto cv. "Oso Grande". ND = sin dato.

^z Índice de Severidad. Entre paréntesis porcentaje de plantas muertas.

^w Media de los cultivares. Mínima Diferencia Significativa (0,01) = 2,48

RESPUESTA DE LOS CULTIVARES A LA ENFERMEDAD ^x							
Nº I.M.I.	OSO G.	CHANDLER	CAMAROSA	PÁJARO	SELVA	MEDIA DE CVS ^w	FR ^y
346326	3,80 (40) ^z	3,90	5,00 (40)	2,20	5,50 (60)	4,08	+
348487	1,00	1,00	1,00	1,60	4,50 (40)	1,82	+
348489	2,60 (40)	4,20 (40)	8,40 (100)	5,60 (60)	7,00 (80)	5,56	+
348493	2,40 (20)	6,80 (80)	2,50 (20)	6,80 (80)	6,80 (80)	5,06	+
348494	3,80 (40)	2,60 (40)	8,30 (100)	3,90 (40)	8,50 (100)	5,42	+
348496	5,40 (60)	4,50 (40)	5,30 (60)	3,50 (20)	4,10 (40)	4,56	+
348499	3,80 (40)	5,40 (60)	8,30 (100)	7,00 (80)	7,85 (90)	6,47	+
348500	6,90 (80)	4,30 (40)	8,40 (100)	7,10 (80)	5,50 (60)	6,44	+
348501	3,80 (40)	6,90 (80)	6,90 (80)	6,70 (80)	8,40 (100)	6,54	+
348502	8,00 (100)	5,30 (60)	5,40 (60)	7,00 (80)	7,20 (80)	6,58	+
351247	2,40 (20)	2,00	5,30 (60)	5,80 (60)	3,90 (40)	3,88	ND
351253	2,40 (20)	1,00	1,10	3,90 (40)	4,30 (40)	2,54	+
351254	2,40 (20)	3,00 (20)	2,60 (20)	5,20 (60)	5,10 (40)	3,66	+
351255	5,40 (60)	5,40 (60)	8,20 (100)	5,40 (60)	5,50 (40)	5,98	+
351587	2,40 (20)	5,20 (60)	8,30 (100)	7,00 (80)	8,40 (100)	6,26	+
351589	1,00	5,90 (60)	1,00	1,90	2,70 (20)	2,50	ND
360086	1,00	1,10	2,40 (20)	3,90 (40)	5,30 (60)	2,74	-
364856	3,80 (40)	6,70 (80)	5,30 (60)	6,90 (80)	4,20 (40)	5,38	+
367466	2,40 (20)	8,00 (100)	6,60 (80)	3,80 (40)	8,10 (100)	5,78	ND
367467	5,20 (60)	5,90 (60)	8,30 (100)	4,50 (40)	8,40 (100)	6,46	+
367468	3,80 (40)	2,80 (20)	6,60 (60)	5,70 (60)	4,00 (20)	4,58	+
MEDIA ^v	3,20	4,46	4,65	4,04	4,48	4,17	

TABLA 9 B.- Respuesta de cultivares de fresa a la inoculación con distintos aislados de *C. acutatum*.

^x Incidencia de ACR en distintos cultivares. Escala 1 - 8; 1 sin síntomas (no se aísla el patógeno), 8 planta muerta.

^y Presencia (+) / ausencia (-) de síntomas de antracnosis en fruto cv. "Oso Grande". ND = sin dato.

^z Índice de Severidad. Entre paréntesis porcentaje de plantas muertas.

^v Media de los aislados.

^w Media de los cultivares. Mínima Diferencia Significativa (0,01) = 2,48

RESPUESTA DE CULTIVARES A LA ENFERMEDAD ^x							
Nº I.M.I.	OSO G.	CHANDLER	CAMAROSA	PÁJARO	SELVA	MEDIA DE CVS ^w	FR ^y
345047	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	+
345049	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,20	ND
345050	1,00	1,00	1,00	3,80 (40)	1,90	1,74	+
346325	1,00	5,30 (60)	7,00 (80)	5,70 (60)	6,70 (60)	5,14	+
348152	1,00	3,90 (40)	6,60 (80)	2,40 (20)	1,00	2,98	+
348153	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-
348159	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	ND
348160	1,00	2,00	8,20 (100)	4,00 (40)	5,40 (60)	4,12	+
348163	6,90 (80)	5,30 (60)	3,90 (40)	3,90 (40)	8,20 (100)	5,64	ND
348167	1,00	2,40 (20)	2,40 (20)	3,90 (40)	4,20 (40)	2,78	+
348168	3,80 (40)	2,60 (20)	7,80 (80)	3,80 (40)	6,80 (80)	4,96	ND
348172	1,00	5,50 (60)	8,00 (100)	5,40 (60)	8,50 (100)	5,68	+
348174	2,40 (40)	1,00	1,00	2,40 (40)	2,40 (40)	1,84	+
348175	1,00	3,80 (40)	3,80 (40)	2,60 (20)	8,10 (100)	3,86	+
348177	5,20 (60)	2,70 (40)	8,30 (100)	6,80 (80)	8,20 (100)	6,24	+
348178	3,80 (40)	1,00	1,00	2,40 (40)	1,00	1,84	+
348182	2,40 (40)	2,40 (40)	8,20 (100)	3,80 (40)	4,10 (40)	4,18	+
MEDIA ^v	2,09	2,52	4,19	3,29	4,15	3,25	

TABLA 10 .- Respuesta de cultivares de fresa a la inoculación con distintos aislados de *C. fragariae*.

^x Incidencia de ACR en distintos cultivares. Escala 1 - 8; 1 sin síntomas (no se aísla el patógeno), 8 planta muerta.

^y Presencia (+) / ausencia (-) de síntomas de antracnosis en fruto cv. "Oso Grande". ND = sin dato.

^z Índice de Severidad. Entre paréntesis porcentaje de plantas muertas.

^v Media de los aislados.

^w Media de los cultivares. Mínima Diferencia Significativa (0,01) = 3,24

Los cultivares más susceptibles a *C. fragariae* son "Camarosa" y "Selva". Howard y colaboradores (1992) consideran a "Selva", "Pájaro" y "Chandler" como

muy susceptibles a esta especie. En este caso, globalmente, los dos primeros presentan respuesta intermedia y el último resistencia, no siendo ninguno de los cultivares ensayados susceptible. En "Camarosa" y "Selva" la respuesta es de susceptibilidad frente al 41,18% de los aislados ensayados; en el de "Chandler" y "Pájaro" frente al 17,65% y por último "Oso Grande", que sólo presenta este tipo de respuesta frente al 11,76% de los aislados.

Al comparar los valores medios de la respuesta inducida por los distintos aislados sobre los cultivares considerados, encontramos una $MDS(0,01) = 3,46$; que confirma que la respuesta intermedia se encuentra entre valores de 3,10 y 4,90; mientras que por encima o por debajo la respuesta global al aislado sería de susceptibilidad o resistencia (Tabla 10). En el caso de los aislados considerados *C. acutatum* la diferencia es de 2,48, con lo que supondría una respuesta intermedia entre 2,72 y 5,20 (Tabla 9 A y 9 B).

La tabla 11 muestra el comportamiento de los distintos cultivares a la inoculación con aislados de la especie *C. gloeosporioides*, aunque globalmente los cultivares "Chandler" y "Camarosa" parecen ser los más susceptibles, no existen diferencias significativas ($MDS(0,01) = 3,63$) entre la incidencia media de los aislados frente a cada uno de los cultivares. Indicar que sobre el cultivar "Camarosa" todos los aislados provocaron la muerte de al menos un 20% de las plantas durante el período de estudio.

Los aislados de la especie *C. miyabeana*, procedentes de Oceanía y supuestamente patógenos de fresa, indujeron una respuesta media de los cultivares ensayados de poca susceptibilidad, provocando claros síntomas en fruto sólo uno de ellos (I.M.I 345578). El aislado 345581, que presenta un índice de severidad medio de 1,30 y no induce síntomas en fruto, no formó apresorios (Tabla 12). Considerando las otras especies estudiadas, *C. miyabeana* no debería ser considerado un patógeno significativo sobre los cultivares ensayados.

RESPUESTA DE CULTIVARES A LA ENFERMEDAD ^x							
Nº I.M.I.	OSO G.	CHANDLER	CAMAROSA	PÁJARO	SELVA	MEDIA DE CVS ^w	FR ^y
324983	1,00	1,00	3,80 (20)	1,00	2,40 (20)	1,84	ND
324984	5,30 (60)	8,30 (100)	8,30 (100)	1,80	8,20 (100)	6,38	+
324985	5,20 (60)	8,40 (100)	8,10 (100)	5,50 (60)	7,00 (80)	6,84	ND
324988	1,00	1,00	2,50 (20)	1,30	1,40	1,44	ND
345051	1,00	1,00	3,90 (40)	1,00	1,00	1,58	ND
345052	3,80 (40)	8,10 (100)	2,40 (20)	2,40 (20)	6,70 (80)	4,68	+
351257	4,20 (40)	8,30 (100)	7,10 (80)	8,50 (100)	8,40 (100)	7,30	+
360928	3,80 (40)	5,10 (40)	5,20 (60)	4,00 (20)	3,90 (40)	4,40	+
MEDIA ^v	3,16	5,15	5,16	3,19	4,88	4,30	

TABLA 11.- Respuesta de cultivares de fresa a inoculación con distintos aislados de *C. gloeosporioides*.

^x Incidencia de ACR en distintos cultivares. Escala 1 - 8; 1 sin síntomas, 8 planta muerta.

^y Presencia (+) / ausencia (-) de síntomas de antracnosis en fruto cv. "Oso Grande". ND = sin dato.

^z Índice de Severidad. Entre paréntesis porcentaje de plantas muertas.

^v Media de los aislados.

^w Media de los cultivares. Mínima Diferencia Significativa (0,01) = 3,05

RESPUESTA DE CULTIVARES A LA ENFERMEDAD ^x							
Nº I.M.I.	OSO G.	CHANDLER	CAMAROSA	PÁJARO	SELVA	MEDIA DE CVS ^w	FR ^y
345578	1,00	2,10	2,40 (40)	1,00	2,40 (40)	1,78	+
345580	1,00	1,00	2,40 (40)	1,00	1,00	1,28	ND
345581	1,00	1,00	1,00	1,00	2,50 (20)	1,30	-
345585	1,00	2,40 (20)	ND	1,00	1,00		ND
MEDIA ^v	1,00	1,625		1,00	1,725		

TABLA 12 .- Respuesta de cultivares de fresa a la inoculación con distintos aislados de *C. miyabeana*.

^x Incidencia de ACR en distintos cultivares. Escala 1 - 8; 1 sin síntomas, 8 planta muerta.

^y Presencia (+) / ausencia (-) de síntomas de antracnosis en fruto cv. "Oso Grande". ND = sin dato.

^z Índice de Severidad. Entre paréntesis porcentaje de plantas muertas.

^v Media de los aislados.

^w Media de los cultivares. Mínima Diferencia Significativa NS

Se analizó la respuesta de cultivares de fresa a dos aislados de *C. coccodes*, agente causal de antracnosis en tomate, observándose que algunos de los cultivares presentaban respuesta susceptible a al menos uno de ellos, es decir estos hongos son capaces de inducir no sólo síntomas en fruto en condiciones controladas, como indicaban Maas y Howard (1985), sino también de provocar ACR en fresa (Tabla 13).

RESPUESTA DE CULTIVARES A LA ENFERMEDAD ^x							
Nº I.M.I.	OSO G.	CHANDLER	CAMAROSA	PÁJARO	SELVA	MEDIA DE CVS ^w	FR ^y
363581	3,90 (40)	1,00	5,30 (60)	1,00	3,30 (20)	2,90	ND
363582	1,00	3,40 (20)	2,40 (20)	1,00	8,00 (100)	3,16	+
MEDIA^v	2,45	2,20	3,85	1,00	5,65	3,03	

TABLA 13.- Respuesta de cultivares de fresa a la inoculación con distintos aislados de *C. coccodes*.

^x Incidencia de ACR en distintos cultivares. Escala 1 - 8; 1 sin síntomas, 8 planta muerta.

^y Presencia (+) / ausencia (-) de síntomas de antracnosis en fruto cv. "Oso Grande". ND = sin dato.

^z Índice de Severidad. Entre paréntesis porcentaje de plantas muertas.

^v Media de los aislados.

^w Media de los cultivares. Mínima Diferencia Significativa NS

En cuanto a la respuesta inducida mediante la inoculación de los cultivares con el hongo del género *Colletotrichum* aislado en la provincia de Huelva, indicar que produce síntomas de antracnosis en frutos de fresa de los cultivares "Oso Grande", "Chandler" y "Pájaro". Los índices de severidad de ACR ocasionados por dicho patógeno son: "Oso Grande" 7,33; "Pájaro" 6,95; "Camarosa" 6,55; "Chandler" 5,75 y "Selva" 3,9. Ocasiona una respuesta media de 6,10; valor que no difiere significativamente del obtenido cuando se inoculan el 53,49% de los aislados tipo "acutatum" (Tablas 9A y 9B), el 52,94% de los "fragariae" (Tabla 10) y el 62,50% de los "gloeosporioides" (Tabla 11). Sólo el cultivar "Selva", considerado por Denoyés-Rothan y colaboradores (1996) como resistente, ofrece una respuesta de tipo intermedio. Lo que se puede interpretar, comparando con el conjunto estudiado como un aislado virulento.

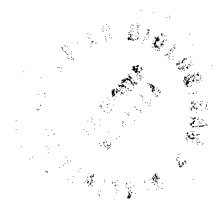
Como indican los datos no sólo no existe un cultivar que sea resistente a todas las razas de *C. acutatum*, *C. fragariae* y *C. gloeosporioides* (Howard et al., 1992), sino que la respuesta de los cultivares a las distintas formas de cada una de las especies no es homogénea. En conjunto el cultivar más susceptible a todos los aislados del género es "Camarosa", siendo globalmente más virulentos los aislados de la especie *C. gloeosporioides*.

4.2.7.- Identificación de los aislados mediante el uso de anticuerpos monoclonales

La Tabla 14 muestra la respuesta de cada uno de los aislados (Tabla 5, en Materiales y métodos) a los anticuerpos monoclonales ensayados.

Todos los aislados considerados como pertenecientes al género *Colletotrichum* dan respuesta positiva al anticuerpo específico del género, aunque algunos de ellos resulten debilmente patógenos de fresa (Apartado 4.2.6). Dan respuesta positiva al anticuerpo específico de conidias de *C. acutatum* aquellos que en origen se identificaron como pertenecientes a dicha especie, así como el aislado marcado como CT-2, originario de la provincia de Huelva, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (C.E.C.T.) como perteneciente a la especie *Colletotrichum acutatum* con el número CECT 20240.

Dos aislados considerados como incluidos en la especie *C. gloeosporioides* (números I.M.I. 324988 y 345051), responden positivamente al anticuerpo MAFF 26, específico de *C. acutatum*. El primero de ellos forma ascas y resulta debilmente patógeno; el segundo es también debilmente patógeno pero no forma ascas en las condiciones ensayadas.



ANTICUERPO MONOCLONAL		
AISLADO ^x	MAFF 26 específico de <i>C. acutatum</i>	MAFF 27 específico de <i>Colletotrichum</i> spp.
<i>C. gloeosporioides</i> 324984	-	+
<i>C. gloeosporioides</i> 324988	+	+
<i>C. acutatum</i> 324993	+	+
<i>C. acutatum</i> 324995	+	+
<i>C. acutatum</i> 345026	+	+
<i>C. acutatum</i> 345029	+	+
<i>C. gloeosporioides</i> 345051	+	+
<i>C. miyabeana</i> 345581	-	+
<i>C. fragariae</i> 348152	-	+
<i>C. fragariae</i> 348167	-	+
<i>C. fragariae</i> 348172	-	+
<i>C. acutatum</i> 348499	+	+
<i>C. acutatum</i> 360086	+	+
<i>C. acutatum</i> 364856	+	+
<i>C. acutatum</i> 367467	+	+
<i>Fusarium</i> spp.	-	-
CT -2	+	+

TABLA 14 .- Respuesta de los aislados a anticuerpos monoclonales.

^x Números tras el nombre específico corresponde a la colección de cultivos del Instituto Micológico Internacional (I.M.I).

4.3.- EPIDEMIOLOGÍA

El desarrollo de ACR, momento de aparición de síntomas e incidencia de la enfermedad, está íntimamente ligado a las condiciones medioambientales que se producen inmediatamente después de la inoculación, de forma que con temperaturas que rondan los 25°C y 100% HR durante 48 horas se produce un 98% de mortalidad de plantas durante la primera semana tras la plantación, lo que impide la observación de la influencia de las temperaturas o precipitaciones registradas en condiciones de campo sobre la enfermedad.

Cuando las plantas se mantienen en cámara frigorífica a baja temperatura (2°C) se retarda la aparición de los síntomas y disminuye la incidencia de la enfermedad, que varió significativamente durante el tercer año ($MDS(0,05) = 3,20$) respecto a los dos primeros, debido posiblemente a las diferentes condiciones medioambientales (Figuras 10, 11 y 12).

La pauta climatológica de los períodos de estudio 1993-94 y 1994-95, corresponden a un perfil de sequía. Durante el primer año se suceden 42 días con pluviometría apreciable ($> 0,05$ mm), un volumen total de 248,10 mm y una media de 5,90 mm/día. Desde Octubre de 1994 a Junio de 1995 el volumen total fue de 162,70 mm, la media de 5,10 mm/día y sólo ocurrieron 32 días de pluviometría apreciable. En ambos casos las primeras precipitaciones se produjeron a primeros de Noviembre. Las temperaturas máximas registradas durante los días siguientes a la plantación oscilaron en torno a los 20°C durante el primer año, siendo ligeramente superiores el siguiente. Con estas condiciones la incidencia de ACR, durante el primer mes de cultivo, no llegó en ninguno de los casos al 2% (Figuras 10 y 11).

Las condiciones climáticas ocurridas durante el período Octubre 1995 - Junio 1996 son sustancialmente distintas sobre todo en lo referente a pluviometría, alcanzándose un total de 824,25 mm, 90 días con precipitaciones apreciables y una media de 9,70 mm/día. Las primeras lluvias se registraron el 26 de Octubre, inmediatamente después de la plantación. Las temperaturas máximas durante esos días presentaron una media de 25°C, llegando a alcanzar en algún momento los 28°C. Esto

provoca un aumento de la incidencia de ACR con respecto a los años anteriores, detectándose durante este primer mes un 14% de plantas muertas entre las plantas inoculadas (Figura 12). Estos datos son coincidentes con los que aportan otros autores que indican que temperaturas en torno a 24°C o superiores y alta humedad relativa favorecen el desarrollo de la enfermedad (Brooks, 1935; Sturgess, 1954; Carver y Horn, 1960; Howard, 1972; McGechan, 1977; Okayama, 1991; Henz et al., 1992).

Durante los dos primeros años aparecen plantas muertas, en bajos porcentajes, de forma más o menos continuada en todo el período de estudio, siempre y cuando vaya asociado a precipitaciones, seguidas de un ligero aumento de las temperaturas, con máximas al menos de 20°C (Figuras 10 y 11).

La figura 12 ilustra claramente que para el desarrollo de ACR es necesario, no sólo alta humedad, sino también determinadas temperaturas; ya que no se detecta muerte de plantas desde mediados de Diciembre hasta mediados de Mayo, coincidiendo con los meses más fríos (temperaturas inferiores a 20°C). Ocurre lo mismo a la inversa, durante los últimos quince días de Abril y primeros de Mayo aumentan las temperaturas, pero la ausencia de lluvias impide la manifestación de los síntomas.

Las podredumbres de fruto comienzan a aparecer a mediados de Febrero, coincidiendo con lluvias seguidas de aumento de las temperaturas (> 20°C). La incidencia durante los dos primeros años es significativamente menor ($MDS(0,05) = 2,97$) que en el tercero, debido a condiciones de humedad más bajas (Figuras 10, 11 y 12).

En 1996, se observan niveles cercanos al 80% de frutos afectados en las últimas cosechas, coincidiendo con lluvias de menor importancia y con temperaturas de 30°C y superiores. Se observaron ocasionalmente frutos verdes sintomáticos, de forma coincidente con la aparición de podredumbres en fruto maduro, exceptuando esas últimas cosechas. Según Wilson et al. (1990), la incidencia de podredumbres de fruto maduros, a altas temperaturas, disminuye al aumentar las horas de alta humedad, no observándose síntomas sobre fruto verdes.

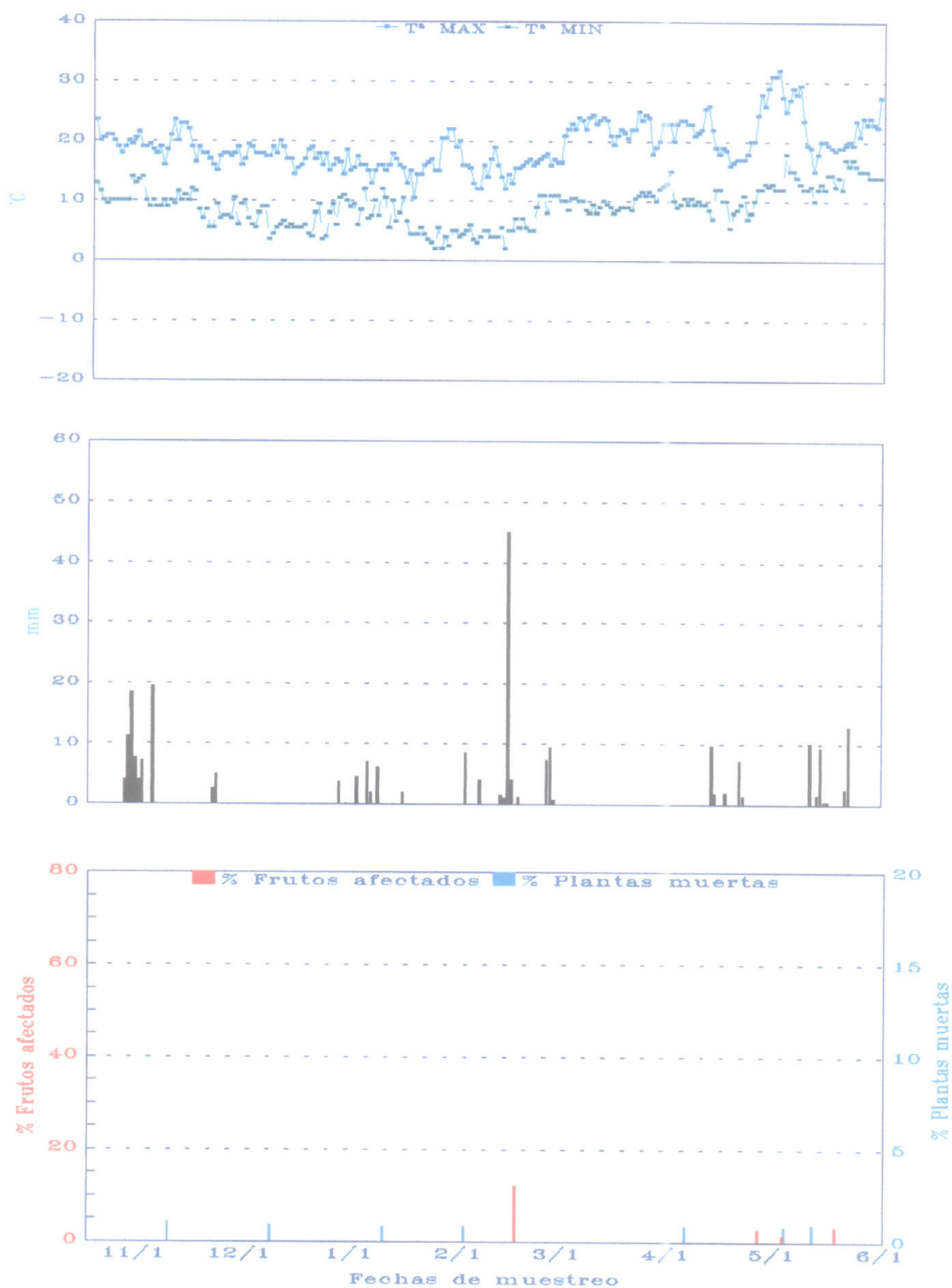


Figura 10.- Influencia de las precipitaciones y temperaturas sobre el desarrollo de la enfermedad (1993 - 94).

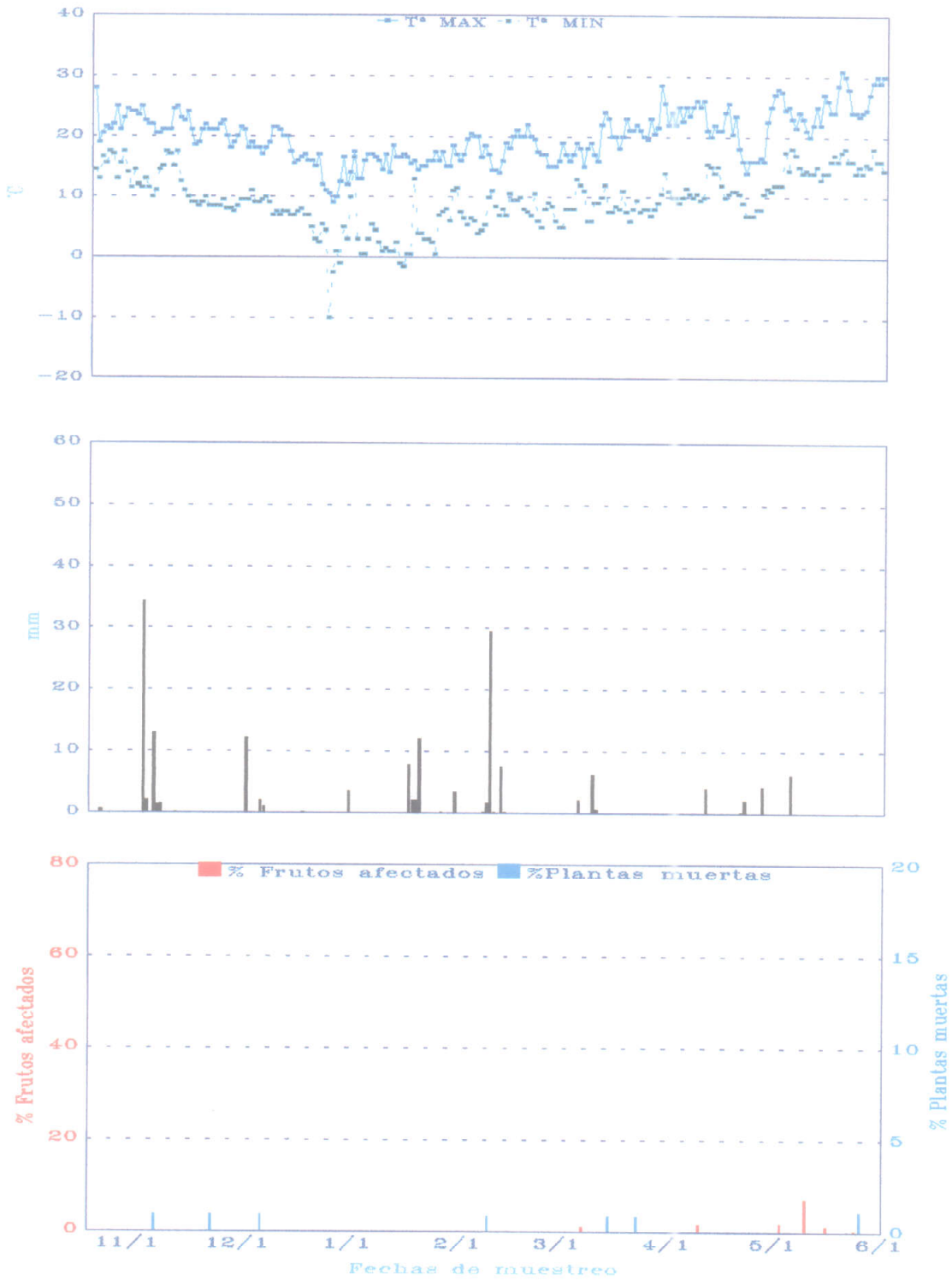


Figura 11.- Influencia de las precipitaciones y temperaturas sobre el desarrollo de la enfermedad (1994 - 95).

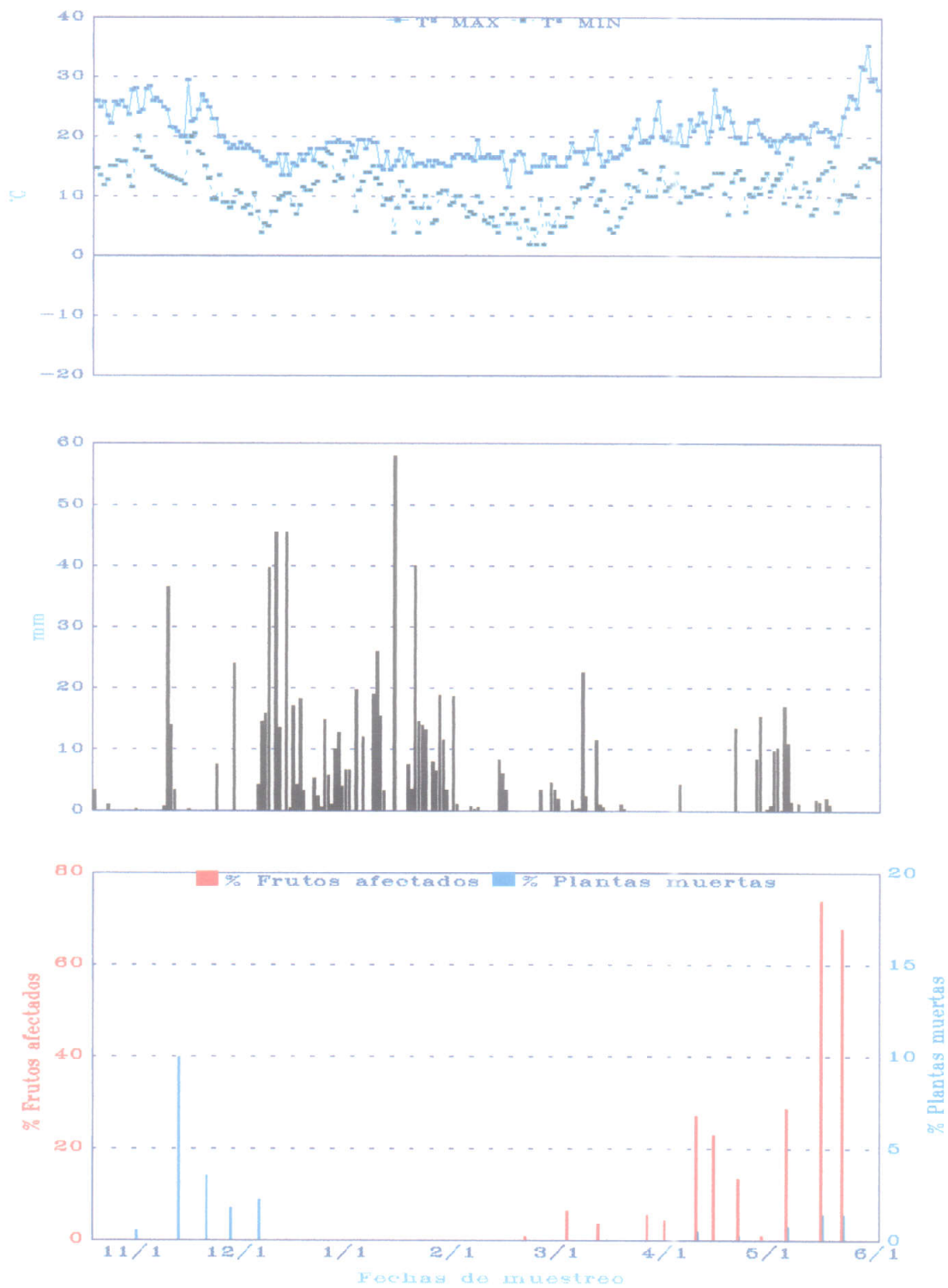


Figura 12.- Influencia de las precipitaciones y temperaturas sobre el desarrollo de la enfermedad (1995 - 96).

4.4.- DISEMINACIÓN DEL PATÓGENO

Howard y colaboradores (1992) indican que la diseminación de las conidias se produce por el agua y el viento, viéndose favorecida por aumentos de temperatura y humedad. Como se observa en las figuras 10, 11 y 12 las mayores incidencias de podredumbre de fruto y de corona se producen tras períodos de lluvia y temperaturas superiores a 20°C.

Durante el tercer año de experiencia se puede observar como las primeras podredumbres de fruto se presentan en las parcelas ocupadas por las plantas inoculadas, detectándose en también en las no infectadas con unos 20 días de diferencia. Se aprecia como a finales de Marzo, la bajada de las temperaturas unida a la ausencia de lluvias, provocó una importante disminución en el porcentaje de frutos afectados, mientras que el aumento de precipitaciones y de temperaturas desde principios de Mayo provocaron un aumento de la incidencia de las podredumbres. También se pudo observar como la incidencia es mayor en las plantas inoculadas que en las control (Figura 13).

En cuanto a la distancia a la que pueden ser dispersada la enfermedad, indicar que dentro de una misma parcela alcanza hasta los 50 m, disminuyendo la incidencia de podredumbres de fruto conforme nos alejamos del punto de inicio de las podredumbres. Este comportamiento coincide con lo indicado por Denoyés-Rothan y colaboradores (1996). En ningún caso se produjeron muertes de las plantas sanas control, no recuperándose el patógeno de los tejidos internos de la corona durante los dos primeros años, cuando la incidencia de la enfermedad es baja. Durante el tercero si se recuperó el patógeno de los tejidos de corona, pero en porcentajes significativamente inferiores a los detectados en el testigo inoculado (Tabla 28), en contra de lo que indican Howard y Albrechts (1984 b).

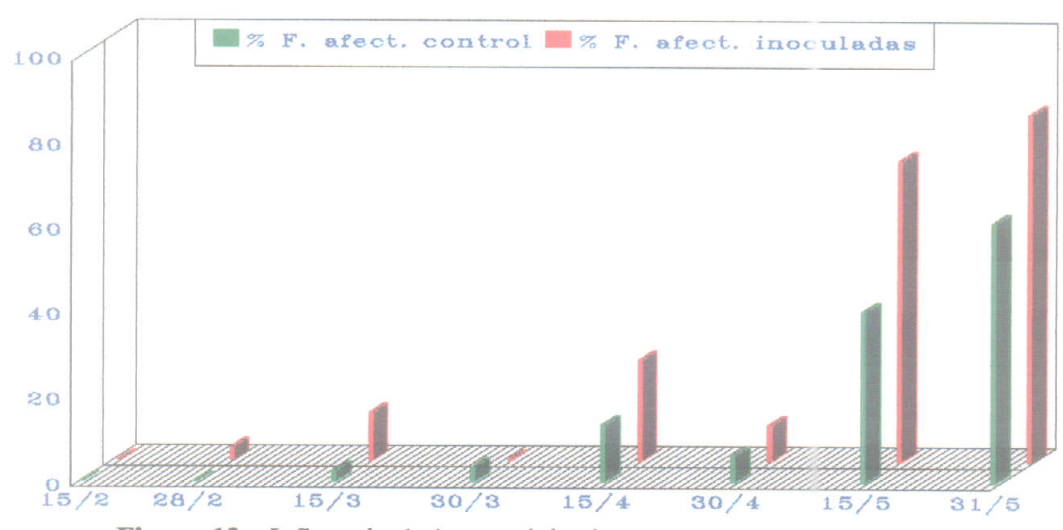
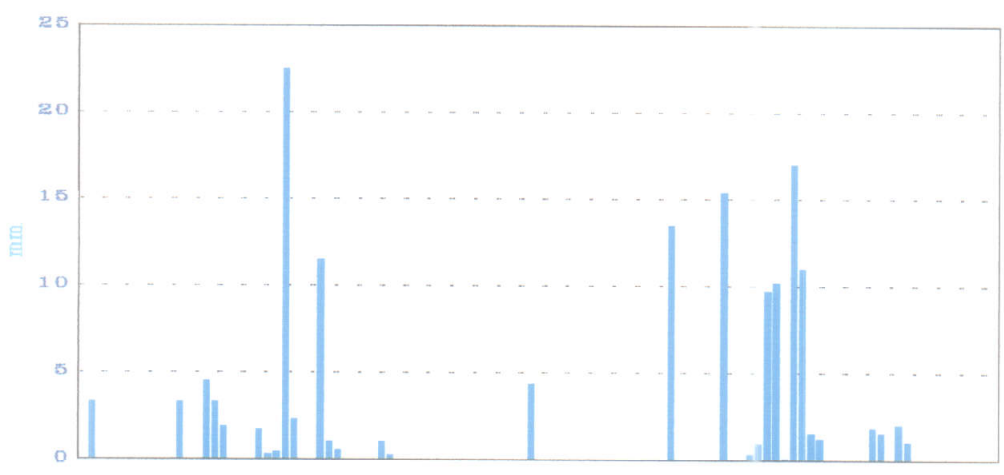
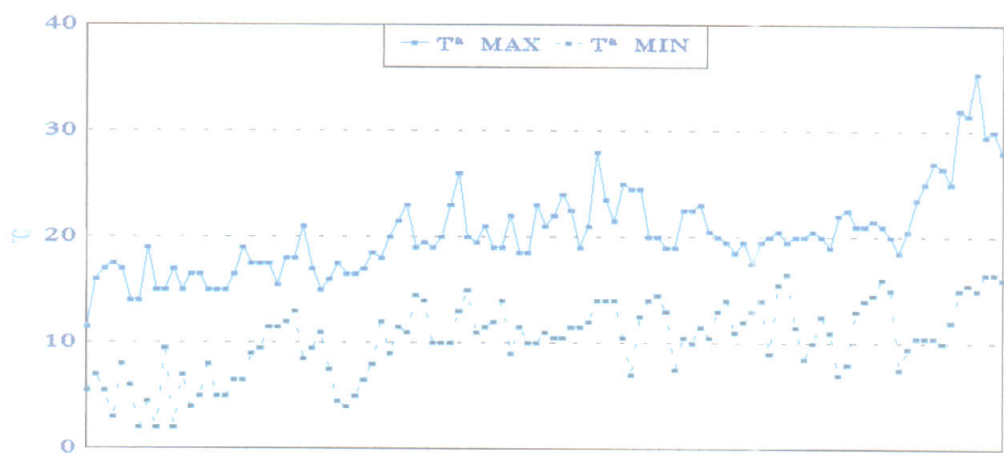


Figura 13.- Influencia de las precipitaciones y temperaturas en la podredumbre de frutos



4.5.- CICLO DE LA ENFERMEDAD

4.5.1.- EXPRESIÓN DE LOS SÍNTOMAS EN CAMPO

Durante los tres años de cultivo se ha observado que el desarrollo de ACR en campo está íntimamente ligado al estado sanitario previo de las plantas, de manera que las no inoculadas no desarrollan la enfermedad (Carver y Horn, 1960; McInnes et al., 1992), no existiendo contagio dentro de una misma parcela, incluso en el caso de alta incidencia de muerte de plantas, como sucede en la campaña 1995-96 (Howard y Albregts, 1984 b).

La tabla 15 muestra la incidencia de la enfermedad en plantas infectadas y control no inoculadas, que comparten una misma parcela, durante los tres años en que se repitió la experiencia.

	% PLANTAS MUERTAS		% FRUTOS AFECTADOS		PRODUCCIÓN (gramos/pl.)	
	CONTROL	INOCULADA	CONTROL	INOCULADA	CONTROL	INOCULADA
1993-94	0	2,04 ^a	0,66 ^a	1,26 ^a	462,67 ^a	412,87 ^a
1994-95	0	2,90 ^a	0,24 ^a	1,45 ^a	499,65 ^a	420,50 ^a
1995-96	0	19,83 ^b	16,78 ^b	26,42 ^c	292,19 ^b	204,39 ^c
MEDIA	0	8,00	5,89	9,71	418,17	345,92

TABLA 15 .- Incidencia de la enfermedad durante los tres años de experiencias.

No se produjeron muertes de plantas por ACR en las parcelas correspondientes a los controles, y si en las plantas inoculadas; la diferencia entre los dos primeros años no es significativa (MDS (0,05) = 3,82), produciéndose un incremento en el tercero que puede tener distintas causas, fundamentalmente climatológicas. Estos resultados indican que el desarrollo de ACR en los campos de producción de fruto está íntimamente relacionado con el hecho de que el stock de plantas esté previamente contaminado, no existiendo posibilidad de contagio a las plantas sanas (Carver y Horn, 1960 y Howard y Albregts, 1984 b).

En la figura 14, en la que se observa el desarrollo fenológico del cultivo

relacionado con la incidencia de ACR, podemos detectar como las primeras muertes de plantas se producen entre 10 y 15 días después de la plantación. En 1994 y 1995, la incidencia de podredumbres de corona se reduce a cero desde el momento que se inicia la floración hasta que fructificación y comienzan a aparecer podredumbres en frutos, lo que ocurre aproximadamente en el mes de Abril. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Howard y colaboradores (1992).

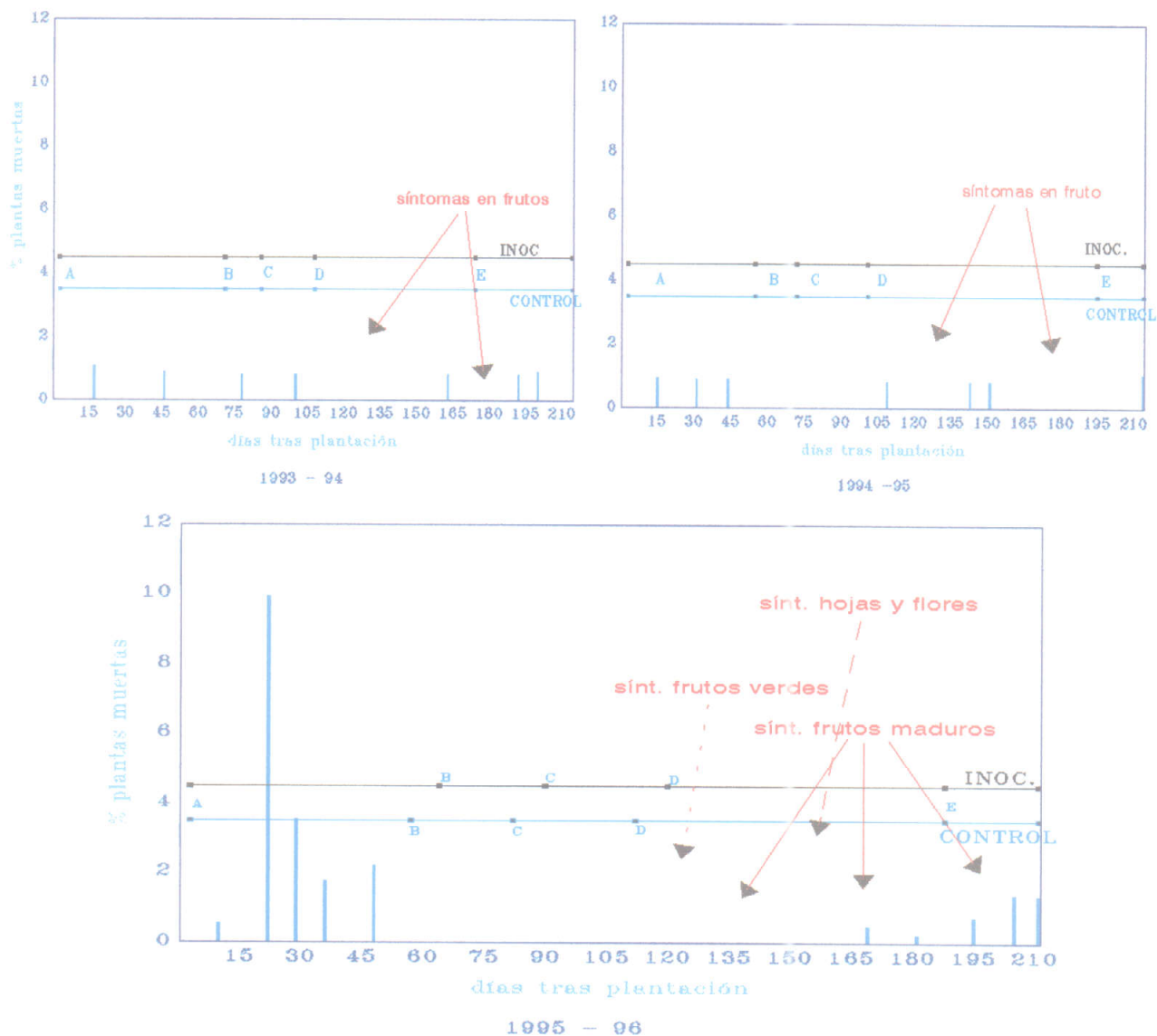
De otra parte, tras la alta incidencia de ACR observada a principios de 1995, se origina un retraso en la floración y fructificación de las plantas inoculadas con respecto a las plantas control, mientras que el estolonamiento se produce simultáneamente.

Las plantas en fructificación y floración parecen más resistentes que aquellas que estolonan o inician su actividad vegetativa, como se observa por el aumento de mortalidad en esos momentos, sobre todo en el último año de experiencia. Howard y colaboradores (1992), llegan a la conclusión de que las plantas de fresa son más resistentes cuando producen frutos que cuando están estolonando.

Los autores anteriormente citados sugieren que existe relación entre fuertes ataques a frutos y el desarrollo de ACR, con la consecuente muerte de plantas al final de la campaña, pero a la vista de los datos presentados (Tabla 15); el hecho de que no se produzca mortandad en las plantas no inoculadas, en ningún momento del ciclo de vida de las mismas, parece sugerir que dicha relación no es cierta, lo cual aparece reforzado por el hecho de que en los aislamientos de tejidos realizados a dichas plantas al final de cada campaña durante los dos primeros años no se detectó el patógeno.

En cuanto a la incidencia de podredumbres de fruto maduro, indicar que durante los dos primeros años el porcentaje de frutos afectados es ligeramente inferior en las plantas control, no siendo la diferencia estadísticamente significativa ($MDS(0,05) = 4,74$) (Tabla 15). Los porcentajes aumentan durante el tercer año, llegando en el caso de las plantas infectadas a afectar a más de una cuarta parte de la producción; siendo significativamente menor en el caso de las plantas control.

Los altos niveles de ACR y podredumbres de fruto sucedidos en 1995,



Fase A.- Inicio actividad vegetativa.

Fase B.- Floración.

Fase C.- Frutos verdes visibles.

Fase D.- Aparición frutos maduros.

Fase E.- Iniciación estolonado.

Figura 14.- Incidencia de antracnosis y desarrollo fenológico del cultivo.

provocan una disminución significativa ($MDS (0,05) = 87,29$) de las producciones con respecto a los años anteriores tanto en las plantas control como en las inoculadas. Sólo durante este último año se observó correlación entre la mortalidad de plantas y la producción de frutos ($CC (0,01) = 0,513$), así como de este último parámetro y el porcentaje de frutos maduros afectados ($CC (0,001) = 0,6405$). Esta correlación se observó también en la campaña 94 - 95, apreciándose un $CC (0,01)$ igual a 0,495.

Sólo se apreciaron síntomas en hojas, flores y frutos verdes durante el tercer año de experiencia (Figura 14), con una baja incidencia que no es cuantificable. Según Howard (1992), la mancha negra de la hoja sólo se detecta en viveros, mientras que las manchas irregulares comienzan a originarse inmediatamente después del trasplante. Los síntomas observados sobre hojas no coinciden con esta descripción (ver Figura 8). En las condiciones de estudio las manchas en hojas y la marchitez de las flores se detectaron a partir de la segunda floración y una vez que se han producido podredumbres de frutos, comenzando primero sobre los verdes.

4.5.2.- FUENTES DE INÓCULO

4.5.2.1.- Supervivencia en suelo

4.5.2.1.A.- Estudios en campo.

En las muestras de suelo tomadas al inicio y al final de cada campaña no se detectó el patógeno. Lo mismo sucede en las extraídas mensualmente, en zonas libres de plantas, durante cada uno de los años en que se repitió la experiencia. Esto ocurre a pesar de la repetición del cultivo y del incremento de la incidencia de la enfermedad. Horn y Carver (1963) observaron este hecho, aumento de la incidencia con la repetición del cultivo, e indicaron la posibilidad de que el agente causal se mantuviera como habitante de suelo. Con posterioridad señalan que plantas sanas en suelos que previamente habían alojado plantas infectadas con *C. fragariae*, no desarrollan la enfermedad, por lo que concluyen que no se trata de un patógeno de suelo (Horn y Carver, 1968). Los resultados obtenidos apoyan esta última hipótesis; sin embargo, otros autores indican que es posible la supervivencia en suelo de especies de

Colletotrichum que afectan a otros cultivos (Blakeman y Hornby, 1966; Farley, 1976; Nair et al., 1983). Eastburn y Gubler (1990), aíslan *C. acutatum* con capacidad patogénica de suelos de campos de fresa infectados, sugiriendo que estos propágulos pueden ser fuente de inóculo, al menos en viveros. Esto sucede en la zona de California, sin embargo en Florida, con un clima más cálido y húmedo no ocurre (Howard et al., 1992).

En cuanto a las muestras obtenidas de la rizosfera de las plantas muertas a lo largo de los tres años de experiencia, hay que indicar que sólo se detecta el patógeno en aquellas cuyas plantas han sufrido ACR, nunca en las de control no inoculadas. La tabla 16, recoge los resultados expresados como porcentaje de muestras de suelo del entorno radicular en las que se detecta el patógeno (sobre el total de plantas muertas por ACR) y número medio de propágulos por gramo de suelo (NPP/g) en dichas muestras.

No existen diferencias significativas (MDS (0,05) = 40,97) entre el número de muestras de las que se aísla el patógeno durante los tres años de cultivo; apreciándose un incremento del NPP durante el segundo y tercer año de cultivo, siendo los valores de este último significativamente diferentes respecto al primero (MDS (0,05) = 704,19).

	% MUESTRAS	NPP/g
1993-94	12,5	199,50 ^a
1994-95	50,00	808,00 ^{a,b}
1995-96	36,85	1024,50 ^b

TABLA 16.- Resultados de los aislamientos de muestras de suelo procedente de la rizosfera de plantas muertas.

En los aislamientos realizados de la rizosfera, al final de cada uno de los años en que se repitió la experiencia, sólo se aisló el hongo de muestras procedentes de plantas inoculadas asintomáticas, de cuyos tejidos se recupera el patógeno, y no de las control. La tabla 17 recoge el porcentaje de muestras de las que se aísla el patógeno así como el número medio de propágulos por gramo de suelo (NPP/g).

	% MUESTRAS	NPP/g
1993-94	67,50	1360,58 ^a
1994-95	35,42 ^a	880,14 ^{a,b}
1995-96	17,50 ^a	443,33 ^b

TABLA 17.- Resultados de los aislamientos de muestras de suelo procedente de la rizosfera de plantas recogidas al final de cada campaña.

Se puede observar que el número de muestras del que se aísla el patógeno es significativamente más alto el primer año (MDS (0,05) = 18,24), siendo también superior el NPP/g (MDS (0,05) = 747,27).

Estos datos indican que el patógeno sólo está presente en la rizosfera de plantas que han sufrido ACR o bien de aquellas asintomáticas de cuyos tejidos se recupera el patógeno. Eastburn y Gubler (1990) ya indicaron la probabilidad de la supervivencia de *C. acutatum* sobre restos de plantas de fresa infectadas.

4.5.2.1.B.- Experiencias en ambiente controlado

En los ensayos llevados a cabo en macetas con suelos artificialmente inoculados no se observa, durante el período de estudio, aparición de síntomas de antracnosis en ninguno de los sustratos utilizados; no detectándose posteriormente el patógeno en los tejidos de las plantas, lo que indica que los propágulos no actúan como fuente de inóculo, contrariamente a lo indicado por Eastburn y Gubler (1990). En el testigo no inoculado no se desarrolla la enfermedad y en las plantas testigo inoculadas y sembradas en suelo estéril se detecta un 100% de muerte por ACR.

En la tabla 18 se observa el número de propágulos detectados por gramo de suelo, media de dos repeticiones, antes y al final de la experiencia. El NPP/g disminuye en los suelos inoculados tras 30 días de cultivo; mientras que en las muestras provenientes de suelos estériles, que contuvieron plantas enfermas, se detecta el patógeno con un número de propágulos por gramo de suelo significativamente diferente y superior a los anteriores (MDS (0,05) = 435,06).

NPP/g		
	INICIO DE LA EXPERIENCIA	FINAL DE LA EXPERIENCIA
SUBSTRATO TURBA	214.700	876,92 ^a
SUBSTRATO ARENA	237.700	1005,78 ^a
CONTROL PLANTAS TEST.	0	0 ^b
CONTROL PLANTAS INOC.	0	1829,71 ^c

TABLA 18.- Variación en NPP/g de suelo en experiencias en macetas.

Se ha estudiado el tiempo de permanencia del patógeno en suelo franco - arenoso inoculado y libre de restos vegetales, en condiciones de luz continua y oscuridad. En este último caso no se recupera el patógeno de ninguna de las muestras de suelo tomadas con periodicidad quincenal.

Cuando la muestra se mantiene en condiciones de luz continua el NPP/g de suelo disminuye de forma continuada como se observa en la figura 15 (resultados media de dos repeticiones). Se reduce al 50% en menos de 6 semanas y al 100% en 25. Estos datos son similares a los obtenidos por Nair y colaboradores (1983) y Farley (1976), que estudiaron la supervivencia en suelo de las conidias de *C. acutatum* f. sp. *pineae* y *C. coccodes*, respectivamente.

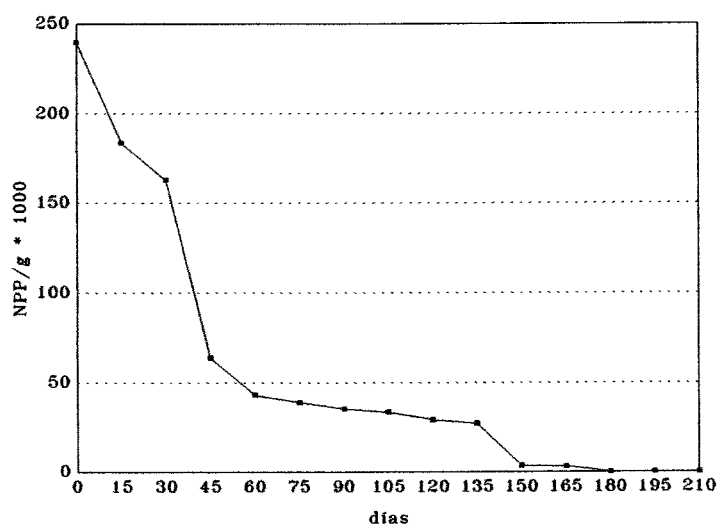


Figura 15.- Variación del NPP/g de suelo, en condiciones de luz continua.

4.5.2.2.- Supervivencia del inóculo en plantas de fresa

A principios de Octubre de 1992 se observaron síntomas de ACR en una plantera situada en la localidad de Palos de la Frontera (Huelva). Se trataba de plantas del cultivar "Chandler", a las que se realizaron aislamientos de tejido detectándose en el 60% de las mismas un hongo de características similares al denominado CECT 20240. No se obtuvo ningún aislado del género *Colletotrichum* de las muestras de suelo que provenían de dicha parcela, que había sido tratada con **bromuro de metilo** antes de iniciarse el cultivo. En un mes se produjo la muerte de las plantas restantes. Desde ese momento se siguieron recibiendo muestras de plantas procedentes de planteras locales y de viveros de altura a las que se realizaron aislamientos de tejidos con los resultados que se muestran en las tablas 19 A y 19 B.

LOCALIDAD ^a	CULTIVAR	RESULTADOS ^b
Moguer 1	Chandler	50%
Moguer 2	Chandler	75%
Palos 1	Chandler	60%
Palos 2	Chandler	-
Palos 3	Chandler	-

TABLA 19 A.- Resultados de las prospecciones en planteras locales (1992).

LOCALIDAD ^a	CULTIVAR	RESULTADOS ^b
Avila 1	Chandler	50%
Avila 2	Chandler	20%
Avila 3	Chandler Oso Grande	33% 25%
Avila 4	Oso Grande Tudla	- -
Avila 5 a 8	Chandler	-

TABLA 19 B.- Resultados de las prospecciones en viveros de altura (1992).

^a Distinto número señala diferente plantera o vivero de procedencia en una misma localidad.

^b - indica ausencia del patógeno en los tejidos. + (%) indica porcentaje de plantas de las que se aísla el patógeno sobre el total muestreado.

Durante este primer año se detectaron plantas afectadas en el 69% de los campos, suponiendo un 38% de los viveros y un 60% de las planteras. Durante el primer mes, tras la plantación, se observó en parcelas donde se habían utilizado plantas procedentes de partidas infectadas, muerte de las mismas en porcentajes sobre el total que oscilaron entre un 12,5 y un 70%; mientras que en parcelas que utilizaron partidas de plantas donde no se detectó el patógeno, no se presentaron síntomas. Durante este año fue mayoritaria la siembra del cultivar "Chandler" (77% de las muestras).

En Septiembre de 1993 se iniciaron las prospecciones de material vegetal destinado a campos de producción para la campaña 93 - 94 (Tablas 20 A y B). Se recibieron muestras de 14 planteras locales, en donde la plantación de la plantas madre se había realizado en Mayo de dicho año; así como 9 de viveros de altura. Las plantas madre procedían de viveros de California (EEUU) y, concretamente, en el caso de las planteras el 80% del material vegetal procedía de los viveros "Lassen". De dos muestras de dicha procedencia se ha aislado el patógeno (Lucena del Puerto 1 y

LOCALIDAD ^a	CULTIVAR	AISLAMIENTO TEJIDOS ^b	AISLAMIENTO RIZOSFERA ^c
Lucena del Puerto 1	Oso Grande	-	+
Lucena del Puerto 2	Oso Grande	-	-
Lucena del Puerto 3	Oso Grande	-	-
Lucena del Puerto 4	Oso Grande	-	-
Moguer 1	Oso Grande	-	-
Moguer 2	Oso Grande	-	-
Moguer 3	Oso Grande	-	-
Moguer 4	Oso Grande	-	-
Moguer 5	Oso Grande	-	-
Moguer 6	Chandler	-	-
Moguer 7	Oso Grande	-	-
Moguer 8	Oso Grande	-	-
Moguer 9	Oso Grande	30%	+
Moguer 10	Chandler	60%	+

TABLA 20 A.- Resultados de las prospecciones preplantación en planteras (1993).

LOCALIDAD ^a	CULTIVAR	AISLAMIENTO TEJIDOS ^b	AISLAMIENTO RIZOSFERA ^c
Avila 1	Oso Grande	-	-
Avila 2	Oso Grande	-	-
Avila 3	Oso Grande	-	-
Avila 4	Oso Grande	17%	-
Avila 5	Oso Grande Chandler	- -	- -
Valladolid 1	Chandler	-	-
Valladolid 2	Oso Grande	-	-
Valladolid 3	Oso Grande	-	-
Segovia	Oso Grande	-	-

TABLA 20 B.- Resultados de las prospecciones preplantación en viveros (1993).

^a Distinto número señala diferente plantera o vivero de procedencia en una misma localidad.

^b - indica ausencia del patógeno en los tejidos. (%) indica porcentaje de plantas de las que se aísla el patógeno sobre el total muestreado.

^c +/- indica presencia/ausencia del patógeno en la rizosfera de las plantas.

Moguer 9). No se conoce el origen primario de las plantas de viveros de altura. En estas prospecciones se detecta el patógeno en el 21% de las muestras de plantera y en el 11% de las de vivero de altura. Se observa la tendencia a la sustitución del cultivar "Chandler" por "Oso Grande", que constituye el 87% del total muestreado.

Durante la campaña de producción de fruto (Octubre - Mayo) se realizó el seguimiento de algunas de las partidas de plantas de estado sanitario conocido, para lo cual se prospectaron fincas en distintas zonas de la provincia de Huelva. Los resultados se muestran en la tabla 21.

Plantas procedentes de un mismo vivero de Segovia, que en los muestreos previos estaban libres de patógeno, se mantuvieron sanas en el caso del cultivar "Oso Grande"; mientras que plantas "Chandler", de estado sanitario previo desconocido, presentan alta incidencia de ACR; indicar que las muestras de suelo tomadas en esta última parcela resultaron libres del patógeno.

Las plantas procedentes de los viveros marcados como Valladolid 2 y Avila 1 se mantienen sanas, incluso en zonas cercanas a otras de alta incidencia de ACR,

como es el caso de la primera citada situada en la zona de Moguer.

LOCALIDAD ^a	PROCEDENCIA ^b	CULTIVAR	AISLAMIENTO TEJIDOS ^c	AISLAMIENTO RIZOSFERA ^d
Moguer	Segovia	Chandler	53,13%	-
El Rocío	Segovia	Oso Grande	-	-
Moguer	Avila 4	Oso Grande	19,27%	-
Moguer	Valladolid 2	Oso Grande	-	-
Bollullos del Condado	??	Oso Grande	-	-
Palos de la Frontera	Avila 1	Oso Grande	-	-

TABLA 21.- Resultados de las prospecciones realizadas en fincas productoras de frutos de fresa en la provincia de Huelva (Octubre 1993 - Mayo 1994).

^a situación de la finca prospectada.

^b vivero de origen.

^c - indica ausencia del patógeno en los tejidos. (%) indica porcentaje de plantas muertas sobre el total muestreado.

^d +/- indica presencia/ausencia del patógeno en la rizosfera de las plantas.

En el mes de Marzo (1994) se detectó ACR en una finca de la zona de Moguer en la que se habían utilizado para la plantación fresas "Oso Grande" de procedencia Avila 4, en cuyas muestras, antes de la plantación, se detectó el patógeno, siendo el porcentaje de plantas muertas del 19,27%, similar al de plantas de las que se había aislado el patógeno en los muestreos previos a la plantación (17%). Se observa una menor incidencia de ACR en plantas del cultivar "Oso Grande", cuya introducción se inició durante este año

En Septiembre de 1994 se continuaron las prospecciones, en preplantación, en las mismas planteras y viveros que el año anterior. La tabla 22 A muestra los resultados obtenidos con el material vegetal procedente de las planteras locales. Si se comparan estos datos con los registrados en las mismas parcelas en 1993 (Tabla 20 A), se puede observar como se aísla el patógeno en plantas procedentes de fincas en las que anteriormente no se había detectado (Moguer 1, 3, 5 y 7); mientras que en el caso de Lucena del Puerto 1 y Moguer 10, en cuyas muestras se aisló el patógeno en 1993, durante este año y en nuevas plantas no se observa. Solamente en la finca número 9

de Moguer se repiten los resultados positivos, aunque con porcentajes inferiores.

Durante el primer mes, tras la plantación, se detecta en una parcela de Moguer, en la que se había utilizado material vegetal procedente de Moguer 6, muerte de plantas por ACR, afectando al 37% del total. En Febrero se detectan los síntomas en varias localizaciones en las que se habían utilizado plantas que provenían de Moguer 1, resultando en un 80% de incidencia entre las plantas muestreadas. En cuanto a las plantas sanas procedentes de Lucena del Puerto 3 y 4, así como Moguer 2 y 8, no se detectaron síntomas en campos de producción.

Se observó una menor incidencia entre las muestras procedentes de viveros de altura, en las que sólo se detectó el patógeno en el 25% de las fincas, mientras que en las planteras el porcentaje se elevó al 53,84% (Tablas 22 A y B).

Se constata la aparición de nuevos cultivares como "Camarosa" y "Tudla". No pudiéndose realizar el seguimiento de las plantas procedentes de viveros de altura.

LOCALIDAD ^a	CULTIVAR	AISLAMIENTO TEJIDOS ^b	AISLAMIENTO RIZOSFERA ^c
Lucena del Puerto 1	Oso Grande	-	-
Lucena del Puerto 3	Oso Grande	-	-
Lucena del Puerto 4	Oso Grande	-	-
Moguer 1	Oso Grande	5,74%	+
Moguer 2	Oso Grande	-	-
Moguer 3	Oso Grande	41,76%	+
Moguer 5	Oso Grande	5,74%	-
Moguer 6	Oso Grande	23,60%	+
Moguer 7	Oso Grande	5,74%	-
Moguer 8	Oso Grande	-	-
Moguer 9	Oso Grande	25,60%	+
Moguer 10	Oso Grande	-	-
Bollullos del Condado 1	Oso Grande	11,00%	-

TABLA 22 A.- Resultados de las prospecciones realizadas en planteras locales (1994).

LOCALIDAD ^a	CULTIVAR	AISLAMIENTO TEJIDOS ^b	AISLAMIENTO RIZOSFERA ^c
Avila 1	Oso Grande	-	-
Avila 2	Oso Grande Camarosa Chandler	7,70% - -	- - -
Valladolid 1	Oso Grande	-	-
Valladolid 2	Oso Grande	-	-
Segovia 2	Oso Grande	-	-
Navarra	Tudla	5,74%	-
Avila 9	Oso Grande	-	-

TABLA 22 B.- Resultados de las prospecciones realizadas en viveros de altura (1994).

^a Distinto n° indica diferente plantera o vivero de procedencia en una misma localidad.

^b - indica ausencia del patógeno en los tejidos. (%) indica porcentaje de plantas de las que se aísla el patógeno sobre el total muestreado.

^c +/- indica presencia/ausencia del patógeno en la rizosfera de las plantas.

En Septiembre de 1995 se muestrearon 13 planteras y 6 viveros de altura, que coincidían con los anteriormente prospectados. Los resultados se exponen en las tablas 23 A y B. Se observó que las condiciones sanitarias de las plantas eran buenas en todas las fincas prospectadas, incluso en aquellas que durante años anteriores habían presentado incidencia de ACR (Moguer 1, 3, 6, 7, 9 y Bollullos del Condado 1). Las plantas madres procedían de viveros Norcal (California, EEUU). Durante la campaña no se detectó la enfermedad en los campos de producción que plantaron este material, pero sí en otros de la zona de Bonares donde se utilizó el cultivar "Chandler", registrándose una incidencia del 70%.

En cuanto a los viveros (Tabla 23 B), sólo se detectó el patógeno en una de las muestras, procedente de uno en el que no se había observado con anterioridad.

En las distintas prospecciones realizadas año tras año se ha observado como independientemente de la localización y de la incidencia registrada, se detecta o no la enfermedad con nuevas partidas de material vegetal, según si este está o no infectado ello podría indicar que el hecho de que la enfermedad se desarrolle o no depende del estado del material de origen, tal y como indican en sus trabajos Carver y Horn (1968)

y McInnes y colaboradores (1990).

LOCALIDAD ^a	CULTIVAR	AISLAMIENTO TEJIDOS ^b	AISLAMIENTO RIZOSFERA ^c
Lucena del Puerto 1	Oso Grande	-	-
Lucena del Puerto 3	Oso Grande	-	-
Lucena del Puerto 4	Oso Grande	-	-
Moguer 1	Oso Grande	-	-
Moguer 2	Oso Grande	-	-
Moguer 3	Oso Grande	-	-
Moguer 6	Oso Grande	-	-
Moguer 7	Oso Grande	-	-
Moguer 8	Oso Grande	-	-
Moguer 9	Oso Grande	-	-
Moguer 10	Oso Grande	-	-
Bollullos del Condado 1	Oso Grande	-	-
Bonares	Oso Grande	-	-

TABLA 23 A.- Resultados de las prospecciones realizadas en planteras locales (1995).

LOCALIDAD ^a	CULTIVAR	AISLAMIENTO TEJIDOS ^b	AISLAMIENTO RIZOSFERA ^c
Avila 1	Oso Grande	5,74%	-
Avila 2	Oso Grande	-	-
Avila 3	Oso Grande	-	-
Valladolid 1	Oso Grande	-	-
Valladolid 2	Oso Grande	-	-
Segovia 1	Oso Grande Camarosa	- -	- -

TABLA 23 B.- Resultados de las prospecciones realizadas en viveros de altura (1995).

^a Distinto n° indica diferente plantera o vivero de procedencia en una misma localidad.

^b - indica ausencia del patógeno en los tejidos. (%) indica porcentaje de plantas de las que se aísla el patógeno sobre el total muestreado.

^c +/- indica presencia/ausencia del patógeno en la rizosfera de las plantas.

Al realizar cortes longitudinales para la realización de los aislamientos de

tejidos, se observó que el patógeno se aislaba no sólo de coronas necróticas sino también de tejidos que no mostraban ningún tipo de coloración. En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos expresados como porcentajes sobre el total de plantas muestreadas, en dos tiempos: pre-plantación y cosecha. Antes de la plantación es mayoritaria la ausencia de síntomas (61,29%), mientras que en cosecha la mayoría de las plantas afectadas presentan necrosis (62,07%). Se encuentran tres puntos de inicio de necrosis: yema, punto de inserción del estolón y lateralmente. Los mayores porcentajes corresponden a penetración por el estolón, lo que podría indicar que la fuente de inóculo es la planta madre, o bien que se ha producido la contaminación por las manipulaciones de las plantas para su trasplante a campos de producción.

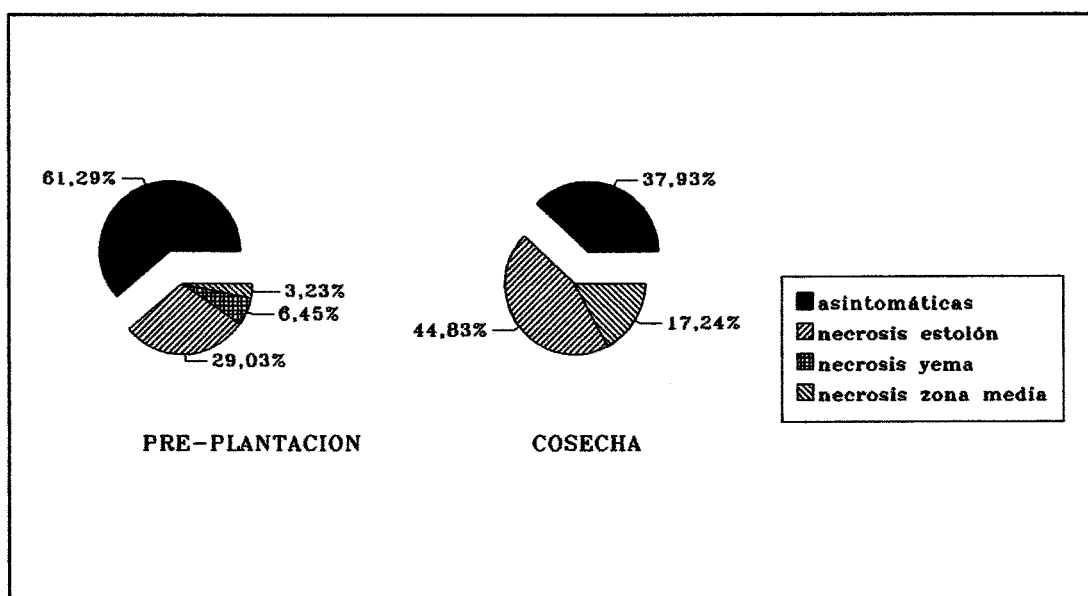


Figura 16.- En corte longitudinal, estado de las coronas de las que se aísla el patógeno.

4.5.2.3.- Huéspedes intermediarios

Las prospecciones encaminadas a la detección de hongos del género *Colletotrichum* sobre plantas adventicias, jaras y restos de pinos resultaron negativas durante los años en que se llevaron a cabo. En la zona de Lepe (Huelva), en una finca que anteriormente había estado dedicada al cultivo de fresa, se detectaron en ramas de eucalipto joven manchas circulares de color rojizo de las que se aisló un hongo del género *Colletotrichum*, de características morfológicas y culturales similares a las del

denominado CECT 20240. Su patogenicidad sobre fresa no pudo ser probada, no volviéndose a detectar en ningún otro momento.

El hongo aislado de hoja de arándano fue identificado mediante análisis serológico como *C. acutatum*. Su temperatura óptima de crecimiento es de 24°C. Sobre PDA-Y la colonia es de color rosado, alcanzando a los siete días de cultivo en luz continua a 25°C un diámetro máximo de 43 mm y no observándose formación del estado ascas en las condiciones marcadas en el apartado 3.2.3.. Sus características son similares a las del aislado CECT 20240.

Al ser inoculado a frutos y plantas de fresa (cultivar "Oso Grande") originó síntomas de antracnosis, reaislándose el patógeno en todos los casos.

Actualmente el cultivo de arándano se introduce en la provincia de Huelva como complementario al de la fresa; parece ser que sus frutos se ven afectados por *C. gloeosporioides* y por *C. acutatum* (Milholland, 1995). En inoculaciones artificiales realizadas sobre hojas de arándano no se reprodujeron los síntomas.

4.6.- MEDIDAS DE CONTROL

4.6.1.- CONTROL QUÍMICO

4.6.1.1.- Fungotoxicidad "in vitro"

Los resultados obtenidos con las materias activas ensayadas "in vitro" se muestran en la tabla 24. Entre todos los fungicidas testados **propiconazol** fue el más efectivo, mostrando una fuerte inhibición tanto del desarrollo miceliar como de conidias con DE_{50} de 0,5 e inferior a 0,5 ppm respectivamente; siendo la CMI en ambos casos de 5 ppm. Freeman y colaboradores (1997) indicaron que la dosis efectiva que origina la inhibición al 50% del crecimiento miceliar para este fungicida, cuando se ensaya frente a *C. acutatum* es de 0,2 ppm, dato similar al obtenido en este trabajo. Smith y Black (1991), en su estudio de control de ACR, producida por *C. fragariae*, en invernadero, observaron que las plantas tratadas con **propiconazol**

presentan el menor índice de enfermedad. Este producto ha dado buenos resultados en el control de antracnosis en post-cosecha en algunos cultivos tropicales (Jeffries et al., 1990).

Bitertanol, hexaconazol, imazalil y "terlaf" fueron efectivos, siendo la CMI para el crecimiento micelial de 50 ppm en el caso del primero de ellos y de 20 ppm para el resto; e incluso inferior (entre 5 y 20 ppm) para la formación de colonias. La DE_{50} para el crecimiento micelial fue de 1, 2, 1 y 5 ppm respectivamente para cada uno de ellos; mientras que fue ligeramente superior en el caso de inhibición de las conidias, exceptuando para el último de ellos con una dosis efectiva de 1 ppm. Estas materias activas junto con **propiconazol, carbendazima y tiabendazol** fueron las escogidas para realizar los ensayos de invernadero y campo. **Carbendazima** inhibe al 50% el crecimiento micelial a dosis de 2 ppm, mientras que son necesarias más de 500 ppm para la inhibición de la formación de colonias. Similar es el caso del **tiabendazol**, que presenta DE_{50} para crecimiento micelial de 1 ppm, siendo de 200 ppm para la formación de conidias. Estos dos fungicidas se incluyeron por estar autorizados para su uso en fresa y ser ambos de amplio espectro (Anónimo, 1996).

Benomilo presentó baja DE_{50} frente al crecimiento micelial, siendo muy elevadas las dosis fungotóxicas en el resto de los casos; estos datos son similares a los obtenidos por otros autores (Delp y Milholland, 1980 a y Gullino et al., 1985). Smith y Black (1991), indicaron la existencia de razas de *C. fragariae* benomilo - resistentes.

Metil-tolclofos, iprodiona y vinclozolina se comportan de manera similar. Los dos últimos, según Gullino y colaboradores (1985), no tuvieron acción fungicida frente a *C. gloeosporioides*; mientras que el primero sí presentó buena actividad, aunque con una CMI mayor de 100 ppm frente a este patógeno.

Captan, clortalonil, diclofluanida y metalaxil+mancozeb resultaron inefectivos. Los dos primeros fueron ensayados por Delp y Milholland (1980 a) frente a *C. fragariae*, resultando con actividad fungistática a dosis baja pero con poca actividad fungicida. **Diclofluanida**, según Gullino y colaboradores (1985), presenta buena actividad contra *C. gloeosporioides*, aunque la CMI frente al crecimiento micelial de ese hongo es superior a 100 ppm, siendo en este ensayo, frente a *C.*

acutatum superior a 500 ppm. **Dicloran** y **Quintoceno** presentaron valores similares y variables, no habiendo sido estudiados por otros autores.

FUNGICIDAS	DE ₅₀ (ppm)		CMI (ppm)	
	Crecimiento miceliar	Formación colonias	Crecimiento miceliar	Formación colonias
Benomilo	> 10	> 500	> 500	> 500
Bitertanol	1	> 1	50	5
Captan	200	> 100	> 500	200
Carbendazima	2	> 500	> 500	> 500
Clortalonil	> 50	> 500	> 500	> 1000
Diclofluánida	50	> 500	> 500	> 1000
Dicloran	10	> 30	> 100	50
Hexaconazol	2	> 5	20	10
Imazalil	1	> 15	20	20
Iprodiona	10	100	> 500	> 500
Quintoceno	20	> 30	> 500	50
Metalaxil + Mancozeb	500	20	> 1000	200
Metil-tolclofos	5	> 500	> 200	> 500
Propiconazol	0,5	< 0,5	5	5
TERLAÍ	5	1	20	10
Tiabendazol	1	200	> 500	500
Vinclozolina	10	> 500	> 500	> 1000

TABLA 24.- Efectividad de diferentes fungicidas frente a la formación de colonias y al crecimiento miceliar de *Colletotrichum acutatum* (CECT 20240).

DE₅₀ = Dosis efectiva al 50%. CMI = Concentración mínima inhibitoria.

4.6.1.2.- Ensayos de control químico en ambiente controlado

Los test sanitarios realizados a las plantas utilizadas tanto en este ensayo en invernadero como en campo, indicaron la ausencia del patógeno de forma previa a las inoculaciones artificiales.

Se ensayaron tres cultivares de fresa: "Oso Grande", "Pájaro" y "Chandler", encontrándose que hubo diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad entre ellos y frente a cuatro de las moléculas fungicidas utilizadas, no existiendo diferencias en los porcentajes de plantas muertas en los testigos no tratados (Figura 17). Es el cultivar "Oso Grande" el que presenta un comportamiento diferencial con respecto al menos a otro de los cultivares en todos los casos.

La eficacia de **hexaconazol** aumenta al incrementarse el tiempo de exposición, la recta media de regresión señala mayor control al aumentar la dosis. En el caso de **tiabendazol** cualquiera de las dosis o tiempos empleados produce una disminución del porcentaje de plantas muertas con respecto al testigo de entre 83 y 67%, excepto en el caso de "Oso Grande" (de 0% a DB 15' al 43% a DA 15' o 30'). **Imazalil** provoca respuesta variable llegando a valores entre 90 - 100% de inhibición cuando se aplican a tiempo de 15 minutos sobre el cultivar "Pájaro"; si se observan los valores medios se aprecia que produce una disminución de la incidencia de la enfermedad cercana al 40% a todas las dosis y tiempos. Con **bitertanol** los mejores resultados se obtienen a DB 30'.

En cuanto a la eficacia media de los distintos tratamientos la tabla 25, recoge los resultados obtenidos con aquellos que no producen efectos significativamente diferentes según los cultivares. Se observa que "**terlaí**" a dosis bajas produce una disminución en el porcentaje de muerte de plantas con respecto al testigo inoculado cercana al 90%. **Propiconazol** a DA 30 sólo reduce la incidencia en un 21%, de otra parte **carbendazima** disminuye su eficacia al aumentar el tiempo de inmersión. En relación al **propiconazol** un efecto fitotóxico, observándose un crecimiento anormal de las plantas tratadas, caracterizado por un menor desarrollo y hojas de color verde oscuro, este comportamiento también lo describen otros autores. Según Smith y Black (1991), **propiconazol** disminuye significativamente los índices de antracnosis en su fase de podredumbre de corona, cuando está originada por *C. fragariae*. Freeman y colaboradores (1997), determinan que cuando el agente causal es *C. acutatum* mueren el 50% de las plantas tratadas con dicho producto (2,5 g/l), produciéndose un efecto fitotóxico no descrito.



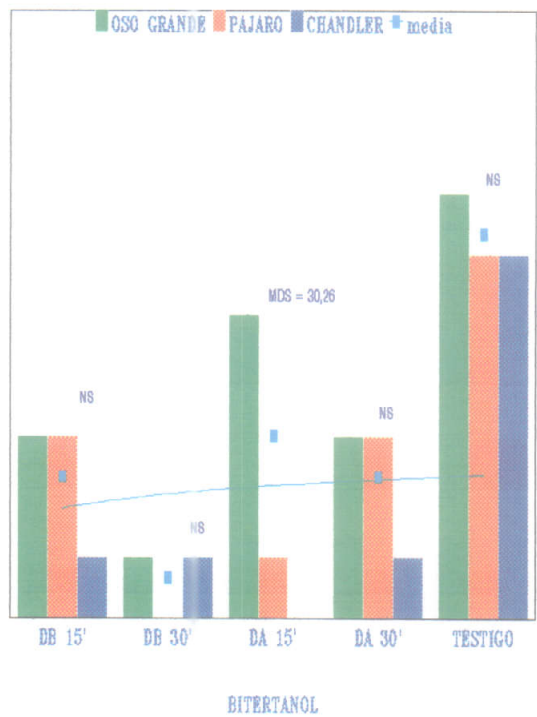
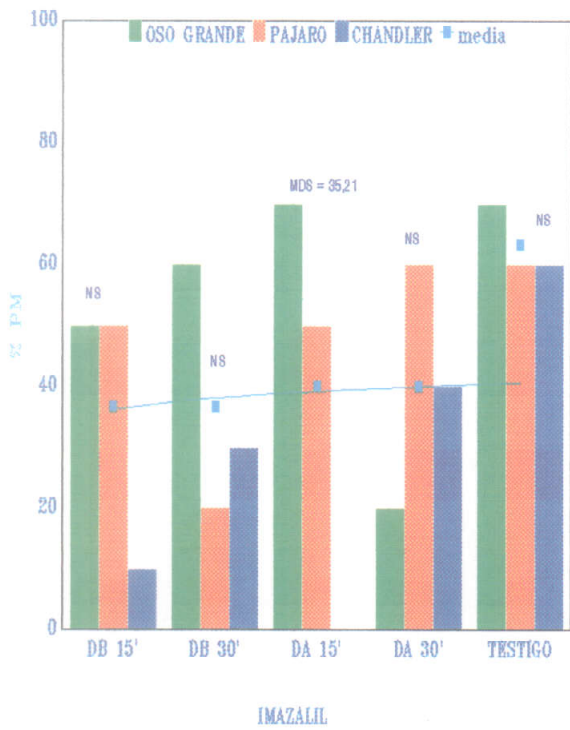
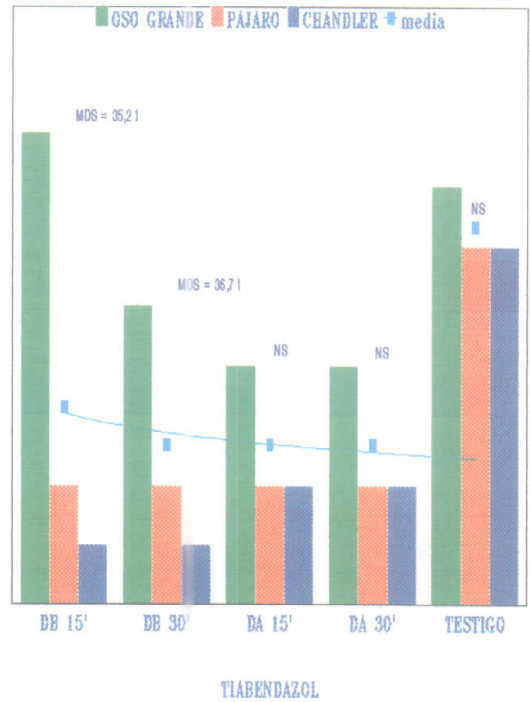
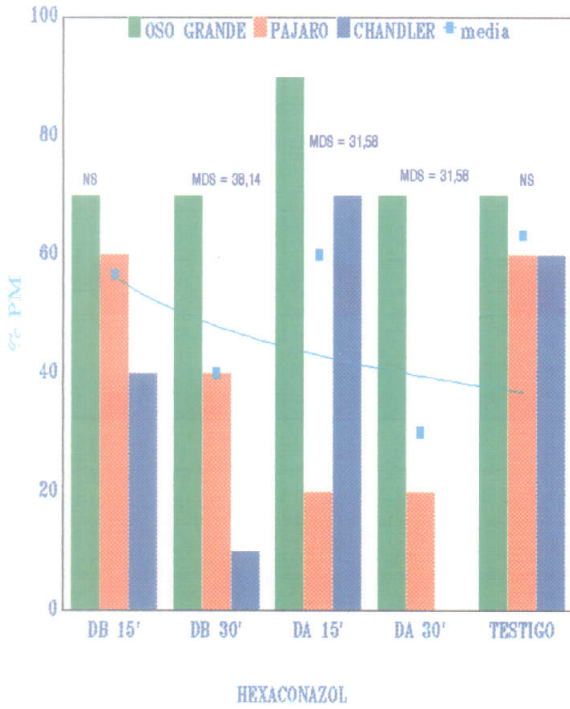


Figura 17.- Comportamiento diferencial de la incidencia de ACR entre cultivares frente a fungicidas en invernadero.

(Cada punto indica porcentaje medio de muerte de plantas, n = 30)

		CULTIVAR			
FUNGICIDA	TRATAMIENTO	OSO GRANDE ^a	CHANDLER ^b	PAJARO ^c	MEDIA ^d
HEXACONAZOL	DB 15'	70	40	60	56,7
PROPICONAZOL	DB 15'	40	40	30	36,7
	DB 30'	40	30	10	26,7
	DA 15'	50	10	40	33,3
	DA 30'	60	60	30	50,0
TIABENDAZOL	DA 15'	40	20	20	26,7
	DA 30'	40	20	20	26,7
IMAZALIL	DB 15'	50	10	50	36,7
	DB 30'	60	30	20	36,7
	DA 30'	20	40	60	40
TERLAI	DB 15'	20	0	10	10,0
	DB 30'	0	10	10	6,7
	DA 15'	50	30	30	36,7
	DA 30'	30	40	30	33,3
BITERTANOL	DB 15'	30	10	30	23,3
	DB 30'	10	10	0	6,7
	DA 30'	30	10	30	23,3
CARBENDAZIMA	DB 15'	20	20	0	13,3
	DB 30'	30	30	10	23,3
	DA 15'	30	20	10	20
	DA 30'	40	10	30	26,7
TESTIGO INOCULADO		70	60	60	63,3
TESTIGO NO INOCULADO		0	0	0	0

TABLA 25.- Porcentajes medios de plantas muertas 30 días después del tratamiento con fungicidas, en condiciones de invernadero.

^a MDS (0,05) = 38,22; ^b MDS (0,05) = 31,59; ^c MDS (0,05) = 34,59

^d media entre columnas; MDS (0,05) = 12,04.

4.6.1.3.- Estudio de la eficacia de los fungicidas en condiciones de campo

El porcentaje de plantas muertas durante el primer mes tras la plantación y previo a los tratamientos por pulverización, es mínimo durante los dos primeros años. En el período Octubre - Noviembre de 1993 mueren el 24,32% del total de plantas por ACR. Al año siguiente el porcentaje fue menor, 4,82%, correspondiendo la mitad al testigo inoculado, y repartiéndose el resto por igual entre los tratamientos con **hexaconazol** y **propiconazol**. El número de plantas muertas durante el primer mes en la campaña 1995 - 96 supuso un 76,15% del total (Tabla 26).

No existen diferencias significativas entre los dos primeros años por tratamiento pero sí de estos con el último, excepto en el caso del tratamiento con **bitertanol** y en el testigo no inoculado. Esta diferencia se debe, probablemente, a las condiciones medioambientales producidas en Octubre de 1995, favorables al desarrollo de la enfermedad (Apartado 4.3).

Brooks (1935) indicaba que las aplicaciones de fungicidas no eran efectivas en períodos de lluvias para controlar el progreso de ACR originado por *C. fragariae*, mientras que en caso de menor humedad ambiental algunos fungicidas eran relativamente eficaces. Así se observa como después del trasplante y durante los dos primeros años algunos de los fungicidas utilizados, **imazalil**, "**terlaí**", **carbendazima** y **bitertanol**, así como el tratamiento con hipoclorito sódico, reducen significativamente el porcentaje de muerte de plantas con respecto al testigo inoculado. Durante el tercer año, se observó un aumento del porcentaje de plantas muertas; ninguno de los tratamientos aplicados reduce significativamente la incidencia de la enfermedad con respecto al testigo inoculado, aunque algunos de ellos tampoco presentan diferencias con respecto al testigo no inoculado, no tratado. Los tratamientos que produjeron mejores resultados son **bitertanol**, **tiabendazol**, **carbendazima** y "**terlaí**"; reduciendo el porcentaje de mortalidad con respecto al testigo inoculado no tratado en los siguientes porcentajes: 83, 79, 78 y 37%, respectivamente.

El tratamiento con **hexaconazol** presenta la mayor incidencia de muerte de plantas prácticamente durante los tres años de cultivo, incluso superiores a los del testigo no tratado.

El hipoclorito sódico no fue efectivo el último año, Gubler y colaboradores (1988), ensayaron este producto en el control de ACR, utilizando el cultivar "Pájaro" inoculado artificialmente con *C. acutatum*, observando su ineficacia.

Imazalil controló la aparición de síntomas durante los dos primeros años, mientras que en el tercero sólo produjo una disminución no significativa respecto al testigo inoculado del 11,80%.

MORTALIDAD (%) ^x				
TRATAMIENTO	1993 - 94	1994 - 95	1995 - 96	MDS ^y
TESTIGO NO INOCULADO	0 ^a	0 ^a	0 ^a	NS
TESTIGO INOCULADO	0,49 ^{a,b}	0,76 ^b	14,65 ^{b,c,d}	3,62
HEXACONAZOL	1,01 ^b	0,24 ^{a,b}	24,12 ^{b,d}	17,21
PROPICONAZOL	0,25 ^{a,b}	0,26 ^{a,b}	11,23 ^{a,c,d}	10,66
TIABENDAZOL	0,24 ^{a,b}	0 ^a	2,99 ^{a,b}	2,21
IMAZALIL	0 ^a	0 ^a	12,92 ^{a,b,c,d}	11,56
TERLAI	0 ^a	0 ^a	9,25 ^{a,b}	6,42
CARBENDAZIMA	0 ^a	0 ^a	3,10 ^{a,b}	2,52
BITERTANOL	0 ^a	0 ^a	2,52 ^{a,b}	NS
HIPOCLORITO SÓDICO	0 ^a	0 ^a	21,87 ^{c,d}	17,22
MDS ^z	0,93	0,80	15,52	

TABLA 26.- Porcentaje de mortalidad por ACR de plantas de fresa del cv. "Oso Grande", en condiciones de campo. (Período de observación Octubre - Noviembre)

^x Media del porcentaje de mortalidad de 4 repeticiones, conteniendo cada una 140 plantas.

^y Mínima Diferencia Significativa (MDS) entre columnas (0,01).

^z Mínima Diferencia Significativa (MDS) entre tratamientos (0,01).

El tratamiento con **propiconazol** originó una disminución no significativa, del número de plantas muertas durante los tres años de cultivo, variando entre un 66% el segundo año y el 23% el último. Freeman y colaboradores (1997), indican que dicho fungicida aplicado mediante inmersión en solución (2,5 g/l) de plantas naturalmente

infestadas (*C. acutatum*) reduce la muerte de plantas en un 38%, en condiciones de campo. Cuando se realizan aplicaciones curativas por pulverización, antes de la inoculación, las plantas tratadas presentan un índice de severidad significativamente inferior que el testigo u otras moléculas fungicidas (Smith y Black, 1991). En cualquier caso este fungicida provoca un efecto fitotóxico.

El establecimiento de las plantas en los campos de producción es uno de los momentos más importantes del cultivo, ya que la pérdida de material vegetal supone la necesidad de replantar, con el consiguiente coste económico (Freeman et al., 1997).

Durante los dos primeros años la incidencia de ACR, recogida como decaimiento y muerte de plantas ocurre de manera más o menos continuada a lo largo de todo el período de observación (Octubre - Junio), mientras que en 1995 la muerte de plantas se produce mayoritariamente durante el primer mes tras la plantación, reiniciándose a partir de mediados de Abril. Los porcentajes de mortalidad total, al final de cada experiencia, por años y tratamientos se reflejan en la tabla 27.

Se observa un aumento progresivo de plantas muertas al repetirse la experiencia, no existiendo diferencias significativas entre los dos primeros años. En 1993, todos los fungicidas redujeron significativamente el porcentaje de plantas muertas, excepto **hexaconazol**, cuyas parcelas presentaron un índice de mortalidad similar al testigo inoculado. Sin embargo, en 1994, se pudo observar una reducción del 87% con respecto al testigo; presentando el último año la mayor incidencia de ACR. **Imazalil** reduce significativamente el porcentaje de plantas enfermas durante el primer año, el segundo sólo lo disminuyó en un 42%, no presentando diferencias significativas con el control; en 1995 la incidencia fue similar a la que presentó el testigo inoculado. Se puede considerar que estos fungicidas no controlan la enfermedad en su fase de podredumbre de corona. Igual de inefectivo se considera el tratamiento con hipoclorito sódico, ya que en el último año presenta un porcentaje de plantas muertas superior al testigo inoculado. Gubler y colaboradores (1988), observaron que este tipo de tratamiento por inmersión reducía en casi un 50% la mortalidad de plantas, pero no se consideró efectivo. Estos autores señalan que existen tratamientos que presentan mayores incidencias de la enfermedad que los testigos no tratados.

Propiconazol y "**Terlai**", disminuyen de forma no significativa la incidencia de la enfermedad, al menos durante el tercer año, no presentando diferencias con el control.

La mayor eficacia se obtuvo con **tiabendazol**, **carbendazima** y **bitertanol**; aunque ninguno de ellos produjo un control total.

TRATAMIENTO	MORTALIDAD (%) ^x			MDS ^y
	1993 - 94	1994 - 95	1995 -96	
TESTIGO NO INOCULADO	0 ^a	0 ^a	0 ^a	NS
TESTIGO INOCULADO	2,46 ^b	3,86 ^b	19,95 ^{c,d}	9,83
HEXACONAZOL	2,02 ^{b,c}	0,50 ^a	26,96 ^{c,d}	20,32
PROPICONAZOL	0,74 ^{a,c}	2,05 ^{a,b}	13,76 ^{a,b,d}	10,35
TIABENDAZOL	0,48 ^a	1,25 ^{a,b}	3,87 ^{a,b}	2,38
IMAZALIL	0,73 ^{a,c}	2,23 ^{a,b}	16,28 ^{b,c,d}	15,59
TERLAI	0,25 ^a	0 ^a	10,95 ^{a,b,c}	8,73
CARBENDAZIMA	0,24 ^a	0,49 ^a	4,67 ^{a,b}	3,91
BITERTANOL	0,24 ^a	0,50 ^a	5,06 ^{a,b}	3,24
HIPOCLORITO SÓDICO	0 ^a	0,25 ^a	24,01 ^{c,d}	23,80
MDS ^z	1,48	3,25	16,08	

TABLA 27 .- Porcentajes totales de plantas de fresa del cv. "Oso Grande" muertas por ACR, en condiciones de campo.

^x Media del porcentaje de mortalidad de 4 repeticiones, conteniendo cada una 140 plantas.

^y Mínima Diferencia Significativa (MDS) entre columnas (0,01).

^z Mínima Diferencia Significativa (MDS) entre tratamientos (0,01).

McInnes y colaboradores (1992), sugieren que no existe ningún fungicida para el control de ACR en condiciones de campo. Existen trabajos que consideran eficaces a los fungicidas tipo **prochloraz** tanto "in vitro" frente a *C. gloeosporioides* (Gullino et al., 1985), como "in vivo" frente a *C. acutatum*, aunque con efectos fitotóxicos

(Freeman et al., 1997). Otros consideran que **captafol** disminuye los niveles de ACR, originada por *C. fragariae* (Delp y Milholland, 1980 a y Smith y Black, 1991). La legislación española no permite la utilización en el cultivo de la fresa de ninguno de estos fungicidas.

Los porcentajes de plantas muertas en los testigos inoculados no tratados, son inferiores a los esperados. En inoculaciones artificiales en invernadero y para el cultivar "Oso Grande" morían el 70% de las plantas. Al final de cada uno de los períodos de observación se analizaron un 10% de las plantas de cada tratamiento para observar la presencia o ausencia del patógeno en los tejidos de las mismas, expresando los resultados como porcentaje medio de plantas de cuyas coronas se aísla el patógeno (Tabla 28).

En el testigo inoculado se aísla el patógeno de tejidos de corona durante los tres años de cultivo en una media del 61% de las plantas asintomáticas, existiendo diferencias significativas entre el segundo año, con una media inferior, y los otros dos. En el caso de los tratamientos, sólo existen diferencias significativas entre años, en los casos de "terlaí" y la desinfección con hipoclorito sódico.

En el caso de las plantas control, indicar que no se produjeron durante los períodos de estudio muerte de las mismas (Tabla 27) y que sólo se detectó el patógeno en el último año en porcentaje significativamente inferior al del resto de los tratamientos. En esta campaña las pérdidas de fruto ocasionadas por podredumbre fueron muy elevadas, pudiendo convertirse en fuente de inóculo secundario que provocaran infecciones asintomáticas de coronas (Howard, 1972). La existencia de infecciones latentes sería problemática sobre todo en el caso de que se mantuviera la planta en años consecutivos, práctica poco usual en la zona de Huelva.

En la tabla 28 se observa como durante el primer año los tratamientos reducen significativamente la presencia del patógeno en los tejidos, lo que sólo sucede en el segundo con las aplicaciones de "terlaí", hipoclorito sódico y **bitertanol**, siendo este último junto con **propiconazol** los tratamientos diferenciales en el último año.

TRATAMIENTOS	1993 - 94		1994 - 95		1995 - 96		MDS ^z
	DR ^x	DT ^y	DR	DT	DR	DT	
TESTIGO NO INOCULADO	0	0 ^a	0	0 ^a	5,00	9,21 ^a	NS
TESTIGO INOCULADO	75	60,62 ^b	40	39,28 ^b	67,50	55,68 ^b	16,88
HEXACONAZOL	32,5	33,94 ^c	22,5	28,19 ^{b,c,d}	40	39,46 ^{b,c,d}	NS
PROPICONAZOL	27,5	30,98 ^c	32,5	34,84 ^{b,d}	37,5	37,94 ^{c,d}	NS
TIABENDAZOL	27,5	31,15 ^c	22,5	29,31 ^{b,c,d}	55	47,93 ^{b,c,d}	NS
IMAZALIL	27,5	31,21 ^c	50	45,69 ^b	47,5	42,93 ^{b,c,d}	14,72
TERLAI	17,78	24,75 ^c	5	9,21 ^a	65	53,97 ^{b,c}	NS
CARBENDAZIMA	25	29,87 ^c	33,33	35,41 ^{b,d}	45	42,01 ^{b,c,d}	NS
BITERTANOL	27,5	27,83 ^c	12,5	18,62 ^{a,c,d}	35	36,12 ^d	NS
HIPOCLORITO SODICO	27,5	27,89 ^c	7,5	13,82 ^{a,c}	50	44,96 ^{b,c,d}	23,05
MDS (p)		24,52 (0,01)		14,69 (0,05)		17,74 (0,05)	

TABLA 28 .- Efecto de los tratamientos en la recuperación de *Colletotrichum acutatum* (CECT 20240) de corona de fresa.

^x DR = datos reales, porcentaje de plantas de cuya corona se aísla el patógeno.

^y DT = datos transformados angularmente

^z MDS (0,05) = Mínima Diferencia Significativa entre años

La tabla 29 muestra las producciones (gramos / planta) durante los tres años de cultivo. En todos los casos se aprecian unos rendimientos significativamente menores durante el último.

En el primer año las parcelas más productivas fueron aquellas cuyas plantas habían sido tratadas con **carbendazima** y "**terlai**". Los rendimientos, en las parcelas con **propiconazol** resultaron significativamente menores.

En el último año se observó que los rendimientos en las parcelas control eran significativamente superiores al resto, excepto en el caso de las tratadas con **carbendazima**. Las producciones más bajas se obtuvieron, en general, en las plantas tratadas con **propiconazol**, lo que podría deberse a su efecto fitotóxico.

TRATAMIENTO	1993 - 94	1994 - 95	1995 - 96	MDS ^x
TESTIGO NO INOCULADO	422,10 ^{a,b}	527,45 ^c	262,91 ^c	183,17
TESTIGO INOCULADO	420,99 ^{a,b}	380,13 ^{a,b}	156,90 ^{a,b}	175,96
HEXACONAZOL	360,51 ^{a,b}	449,38 ^{a,b,c}	127,33 ^a	123,06
PROPICONAZOL	323,66 ^a	340,18 ^a	145,20 ^{a,b}	58,81
TIABENDAZOL	378,45 ^{a,b}	432,39 ^{a,b,c}	164,10 ^{a,b}	111,21
IMAZALIL	414,53 ^{a,b}	354,72 ^a	166,31 ^{a,b}	206,12
TERLAI	441,23 ^b	503,23 ^{b,c}	150,63 ^{a,b}	165,65
CARBENDAZIMA	457,29 ^b	413,04 ^{a,b,c}	200,62 ^{b,c}	224,74
BITERTANOL	418,39 ^{a,b}	458,59 ^{a,b,c}	163,72 ^{a,b}	138,00
HIPOCLORITO SODICO	415,76 ^{a,b}	434,81 ^{a,b,c}	141,95 ^{a,b}	70,34
MDS (0,01) ^y	128,06	143,38	72,71	

TABLA 29 .- Producción útil, en gramos por planta.

^x MDS (0,01) = Mínima diferencia significativa entre años.

^y MDS = Mínima diferencia significativa entre tratamientos.

En cuanto a las incidencias de podredumbres de fruto, se detectan diferencias significativas entre los datos del tercer año y los dos anteriores en todos los casos (Figura 18); en estos se observó que existe correlación entre el número de plantas muertas por ACR a lo largo de las campañas y el peso de los frutos que presentan síntomas de antracnosis. Así el primer año el coeficiente de correlación (CC, $p = 0,01$) es de 0,4355; siendo en el segundo de 0,6108 ($p = 0,001$). Durante el último año no se obtuvo ningún tipo de correlación debido a la alta incidencia de podredumbres de frutos que afectan, aunque de forma significativamente inferior (MDS (0,01) = 9,816), incluso a las plantas control en las que no se observó muerte de plantas (Figura 18). Estos datos indican, como señalaron Horn y Carver (1962, 1968), la posibilidad de que exista diseminación de conidias desde los tejidos internos a los frutos, así como el papel de los mismos como fuente de inóculo secundario, provocando infecciones que originan un progresivo aumento de frutos infectados. McInnes y colaboradores (1992), sugirieron que la única fuente de inóculo son las propias plantas de fresa que presentan infecciones latentes contraídas en los viveros.

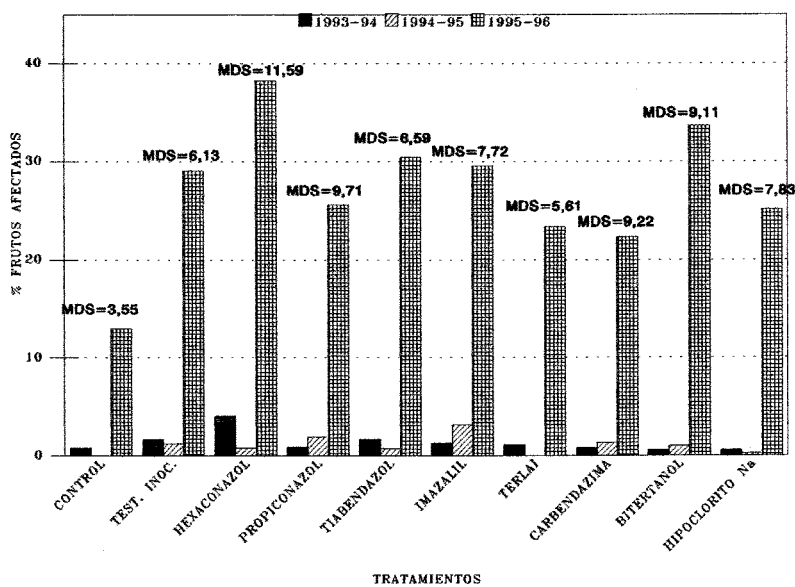


FIGURA 18.- Incidencia de podredumbres de frutos, con diferentes tratamientos fungicidas.

Diferencias entre años por tratamiento:

1993-94 MDS (0,01) = 1,365

1994-95 MDS (0,01) = 2,869

1995-96 MDS (0,01) = 9,816

* CONTROL = Testigo no inoculado, no tratado

La figura 18 recoge la incidencia de podredumbres de frutos en los distintos tratamientos y por años, como porcentaje sobre el total de la producción. Durante el primer año la incidencia de podredumbres de fruto es relativamente baja, siendo significativamente mayor que en el resto en las parcelas tratadas con **hexaconazol** (MDS (0,01) = 1,365). En la campaña siguiente las mayores incidencias se observan en las plantas tratadas con **imazalil** (MDS (0,01) = 2,860); no detectándose frutos afectados en los controles ni en las parcelas tratadas con "terlal".

En 1995, los porcentajes de frutos maduros afectados en las plantas control fue significativamente inferior que en el resto (MDS (0,01) = 9,816); siendo cercana al 40% en las parcelas tratadas con **hexaconazol**, índice incluso superior al que presentan las plantas inoculadas y no tratadas.

Los datos sugieren que los tratamientos aplicados, que se suspendieron al iniciarse la floración, no reducen significativamente la incidencia de antracnosis en su fase de podredumbre de frutos maduros. Denoyés-Rothan y colaboradores (1996), indicaron que las materias activas aplicables al cultivo de la fresa son muy restringidas, existiendo además un estricto control de residuos de pesticidas en fruto, que impide aplicaciones continuadas, de forma que una vez que se inicia la fructificación hay que dar los tratamientos por finalizados. Esta forma de aplicación impide el control de dicha enfermedad, ya que las mayores incidencias se producen desde mediados de Marzo (Figura 12). Para disminuir significativamente la aparición de podredumbres de fruto sería aconsejable partir de un material vegetal sano, es decir, plantas de fresa no infestadas por el patógeno en viveros.

4.6.2.- UTILIZACIÓN DE CULTIVARES RESISTENTES

La tabla 30 muestra la respuesta de los cultivares ensayados al aislado CECT 20240. Se consideran resistentes si el índice de severidad es inferior a 3, de respuesta intermedia 3,1 y 4,9; susceptible cuando es superior a 5; coincidiendo la respuesta de resistencia con porcentajes de muerte de plantas inferiores al 30% (Figuereido et al., 1972)

El cultivar "Oso Grande", mayoritario en la zona de cultivo de Huelva durante los últimos años, resultó susceptible al patógeno, el cual origina un porcentaje de muerte de plantas superior al 80%. Los cultivares "Chandler" y "Pájaro", anteriormente utilizados en la provincia, presentaron respuesta susceptible. Howard y colaboradores (1992), consideran a ambos susceptibles, en todas las fases de la enfermedad, en Florida (EEUU). Estudios de resistencia realizados en Italia, indican que las plantas del cultivar "Pájaro" son muy susceptibles a *C. acutatum*, mientras que las "Chandler" presentan índices de severidad ligeramente inferiores (Faedi, 1991),

resultados similares a los obtenidos cuando se inocula el aislado presente en Huelva.

Actualmente se están utilizando los cultivares "Camarosa" y "Laguna", siendo el primero de ellos susceptible, mientras que el segundo se podría considerar relativamente resistente, ya que el patógeno provoca una mortalidad de plantas del 25%, lo que supondría un alto nivel de riesgo.

De los cultivares "Primella" y "Pandora", que resultan resistentes al patógeno, no se conoce la capacidad de adaptación a las condiciones de cultivo en el S.O. de Andalucía. En Italia son utilizados, considerándolos resistentes a *C. acutatum* (Faedi, 1991). Otros cultivares que podrían ser adaptados por su respuesta de resistencia a *C. acutatum* son "Cuesta" y "Teodora", así como X-301 y CART-2.

De los siguientes cultivares se aisló el patógeno en tejidos radiculares en porcentajes variables: "RB-11" (100%), "RB-14" (67%), "Oso Grande" (100%), "Pájaro" (17%), "Haraline" (60%), "Camarosa" (22%), "Z-39" (67%), "Chandler" (17%), "1-87" (67%), "Linda" (50%), "Darsidor" (14%), "DA-1" (40%), "Percosana" (40%), "Manil" (33%) y "X-301" (33%). Señalar los bajos niveles en cultivares considerados susceptibles ("Pájaro" y "Chandler"), así como la ausencia del patógeno en los tejidos radiculares de los cultivares "Vantage" y "9-33", de comportamiento similar en cuanto a la susceptibilidad de los tejidos de corona con respecto a "1-87" y "Chandler". De entre las variedades resistentes sólo se aisló el patógeno en el caso de "X-301", no obteniéndose en "Cuesta" y "Pandora" que presentaron índices de severidad superiores. Ningún autor incluye los tejidos radiculares como susceptibles y/o resistentes a ninguno de los agentes causales de antracnosis. Existe la posibilidad de que los resultados presentados se deban a la metodología de la inoculación, sin embargo el patógeno se aisló de este tipo de tejidos en plantas no inoculadas artificialmente (Apartado 4.5.2.2).

Según algunos autores, se podría considerar que la respuesta de resistencia a ACR de los cultivares de fresa resultaría en una respuesta similar a otras manifestaciones de la enfermedad (Maas y Galletta, 1989 y Howard et al, 1992), así, en este caso, se observa que de los tejidos radiculares en cultivares resistentes no se aísla el patógeno, en la mayoría de los casos.

CULTIVAR	% PLANTAS MUERTAS	ÍNDICE DE SEVERIDAD ^x	RESPUESTA
RB - 11	100	8,50 ^a	SUSCEPTIBLE
RB - 14	100	8,40 ^{a,d}	SUSCEPTIBLE
OSO GRANDE	83	7,33 ^{a,d,e}	SUSCEPTIBLE
PÁJARO	83	6,95 ^{a,d,e}	SUSCEPTIBLE
HARALINE	80	5,50 ^{a,d,e}	SUSCEPTIBLE
CAMAROSA	78	6,55 ^{a,d,e}	SUSCEPTIBLE
Z - 39	67	6,00 ^{a,d,e,f}	SUSCEPTIBLE
CHANDLER	67	5,75 ^{a,d,e,f}	SUSCEPTIBLE
VANTAGE	67	5,70 ^{a,d,e,f}	SUSCEPTIBLE
1 - 87	67	5,70 ^{a,d,e,f}	SUSCEPTIBLE
9 - 33	67	5,70 ^{a,d,e,f}	SUSCEPTIBLE
RB - 19	67	3,70 ^{b,c,e,f}	INTERMEDIA
LINDA	50	4,75 ^{b,d,e,f}	INTERMEDIA
DARSIDOR	43	4,00 ^{b,c,e,f}	INTERMEDIA
DA - 1	40	4,00 ^{b,c,e,f}	INTERMEDIA
PERCOSANA	40	4,00 ^{b,c,e,f}	INTERMEDIA
MANIL	33	3,50 ^{b,c,f}	INTERMEDIA
LAGUNA	25	2,75 ^{b,c,f}	RESISTENTE
CUESTA	20	2,60 ^{b,c,f}	RESISTENTE
PANDORA	20	2,40 ^{b,c,f}	RESISTENTE
X - 301	0	1,50 ^{b,c}	RESISTENTE
PRIMELLA	0	1,00 ^c	RESISTENTE
CART - 2	0	1,00 ^c	RESISTENTE
TEODORA	0	1,00 ^c	RESISTENTE

TABLA 30.- Respuesta de cultivares de fresa a la infección con *Colletotrichum acutatum* (CECT 20240).

^x Índice de Severidad MDS (0,05) = 3,67

4.6.3.- CONTROL TÉRMICO

4.6.3.1.- Resistencia térmica del patógeno "in vitro"

La eficacia de los tratamientos por inmersión en baño termostatzado se muestran en la tabla 31, observándose una relación directa entre la combinación temperaturas - tiempos de inmersión y el porcentaje de inhibición de formación de colonias. Ninguna de las combinaciones empleadas produjo la muerte del patógeno, aunque a temperaturas de 50 y 55°C, a cualquiera de los tiempos empleados, la efectividad es cercana al 100%; no existiendo diferencias significativas entre estas temperaturas. A 40 y 45°C se obtiene una reducción significativa con respecto al control, pero significativamente menor que a temperaturas superiores.

Los resultados son similares a los obtenidos por Miller y Stodard (1956), cuando ensayan este tipo de tratamiento sobre otros patógenos de fresa. Estos autores determinan que 55°C y 4 minutos, son suficientes para provocar la muerte de *Rhizoctonia solani* y *Verticillium albo-atrum*; mientras que en el caso de *Fusarium* spp. era necesario elevar la temperatura a 65°C, manteniéndola durante 7 minutos.

TIEMPO DE INMERSIÓN	TEMPERATURA DE INMERSIÓN				
	40°C	45°C	50°C	55°C	MEDIA
5 min.	32,73	47,60 ^{a,b}	98,67 ^c	99,36 ^c	69,59
7,5 min.	42,45 ^a	67,57	99,55 ^c	99,61 ^c	77,30
10 min.	50,05 ^b	73,50	99,61 ^c	99,94 ^c	80,78
MEDIA	41,74	62,89	99,28	99,64	

TABLA 31.- Porcentaje de inhibición de la formación de colonias tras tratamientos por inmersión en baño termostatzado (MDS (0,05) = 5,81).

4.6.3.2.- Experiencias de control térmico en ambiente controlado

A la vista de los resultados obtenidos "in vitro" se dispuso un ensayo en invernadero con plantas inoculadas artificialmente, para determinar la efectividad de



los tratamientos térmicos sobre el patógeno cuando este se encuentra en la planta, así como los posibles efectos deletereos de los mismos. No se consideró necesario testar la eficacia de los tratamiento a temperaturas de 45°C y 55°C, ya que no se encontraron diferencias significativas con los realizados a 40°C y 50°C, respectivamente.

La incidencia de muerte de plantas por ACR se muestra en la tabla 32, donde se aprecia como en las plantas control no se produjeron síntomas; aunque por efecto de los tratamientos se pierden entre un 40 y un 60% de las mismas. En el caso de las plantas inoculadas, a temperaturas de 40°C durante 10 minutos se reduce significativamente la incidencia con respecto al testigo inoculado y no tratado en un 40%, al aumentar la temperatura a 50°C se controla al 100%, no recuperándose el patógeno de los tejidos de las plantas. Gubler y colaboradores (1988), indican que tratamientos térmicos a 49,4°C, durante 5 minutos eliminan el patógeno (*C. acutatum*) del interior de los tejidos de la corona, pero no controlan totalmente la enfermedad en campo, en la tabla 32 se observa que al mantener 50°C durante 5 minutos se reduce la mortalidad en un 20%, recuperándose el patógeno de los tejidos.

TRATAMIENTOS	% MORTALIDAD ^x	
	PLANTAS NO INOCULADAS	PLANTAS INOCULADAS
-----	0 ^a	100 ^b
T ^a 40°C / TIEMPO 5'	0 ^a	100 ^b
T ^a 40° / TIEMPO 10'	0 ^a	60 ^c
T ^a 50° / TIEMPO 5'	0 ^a	80 ^{b,c}
T ^a 50° / TIEMPO 10'	0 ^a	0 ^a

TABLA 32.- Tratamientos térmicos en invernadero, incidencia de ACR.

^x % de plantas muertas de las que se aísla el patógeno inoculado, media de 2 repeticiones. MDS (0,01) = 39,08 / MDS (0,05) = 29,26

Según Buchner (1991), temperaturas alrededor de 49°C aplicadas por inmersión durante 5 o 7 minutos no originan daños a las plantas de fresa, aunque podría producirse una reducción en el vigor de las mismas, no aconsejando este tipo

de tratamiento para plantas destinadas a producción de frutos. Según Gubler y colaboradores (1988), este tipo de tratamiento no disminuye significativamente la producción de plantas hijas. En la tabla 33, se observan las producciones medias obtenidas en condiciones de invernadero en las plantas tratadas por inmersión en agua caliente.

TRATAMIENTOS	PRODUCCIÓN (g / Planta)	
	PLANTAS NO INOCULADAS	PLANTAS INOCULADAS
-----	96,85	-
Tª 40°C / TIEMPO 5'	92,33	-
Tª 40°C / TIEMPO 10'	47,86	11,15
Tª 50°C / TIEMPO 5'	41,10	6,73
Tª 50° / TIEMPO 10'	63,80	33,09

TABLA 33.- Producción de frutos (gramos/ planta) tras tratamientos térmicos.

MDS (0,01) = 80,22 / MDS (0,05) = 60,06

Los tratamientos térmicos no reducen significativamente la producción de frutos en las plantas con respecto a las no tratadas, aunque en esas se aprecia un menor vigor. En el caso de las plantas y no tratadas, así como en los tratamientos en los que se originó muerte de plantas la producción es prácticamente nula, sólo en el tratamiento a 50°C y 10 minutos encontramos un rendimiento cercano al de las plantas no inoculadas, pero significativamente menor al control (MDS (0,05) = 60,06).

4.6.4.- CONTROL BIOLÓGICO

4.6.4.1.- Estudio del potencial inhibitorio

El supuesto antagonista hace contacto con las colonias del patógeno a los cinco días de cultivo, cuando el diámetro medio de este es de 33,3 mm; se observa como *Fusarium* spp. crece sobre el patógeno, pero a microscopía óptica no se detecta penetración en la hifa del posible huésped.

Cuando se siembran sobre PDA-Y simultáneamente conidias de ambos hongos, no se aprecia influencia negativa en la germinación del patógeno.

4.6.4.2.- Análisis de la patogenicidad de *Fusarium* spp. frente a plantas de fresa. Influencia sobre el desarrollo de la enfermedad en condiciones controladas

En inoculaciones artificiales con *Fusarium* spp. de frutos, maduros y verdes, así como de plantas de fresa no se observó ningún de síntoma. Sobre los frutos maduros crece el micelio del hongo pero no penetra en el mismo.

En cuanto a la posible influencia de *Fusarium* spp. en el desarrollo de ACR, indicar que los datos obtenidos en la primera repetición de la experiencia fueron negativos, con el resultado de muerte del 100% de las plantas a los 30 días de haber sido inoculadas con *C. acutatum* (CECT 20240); sobreviviendo las plantas control y aquellas inoculadas con el supuesto antagonista.

A los quince días de la inoculación se midió el porcentaje de tejido de corona necrosado en las plantas muertas, detectándose un porcentaje medio del 25,84% en plantas previamente inoculadas con *Fusarium* spp., valor significativamente inferior (MDS (0,05) = 30,13) a los obtenidos cuando sólo se inocula CECT 20240 (67,16%). Si se realiza la inoculación con ambos se obtiene un 75,55% de tejido necrosad, al igual que cuando se inocula primero *C. acutatum* (75,51%). Al analizar este parámetro al final de la experiencia, no se observan diferencias significativas (MDS (0,05) = 24,34) entre los grupos, aunque los valores más bajos corresponden a la inoculación previa con *Fusarium* spp., 59,92% de tejido de corona necrosado, siendo en el resto de los casos de aproximadamente un 70%.

En todos los casos la penetración del patógeno se realiza principalmente por la yema, lo que provoca la inmediata muerte de la planta, sin la posibilidad de observar infecciones latentes.

Al repetir la experiencia se produjo la muerte del 100% de las plantas sólo en el caso de aquellas que se inocularon con el patógeno, reduciéndose en el resto de los supuestos hasta un 30% con respecto a estas, pero no se observaron diferencias

significativas (MDS (0,01) = 45,47 / MDS (0,05) = 33,90).

4.6.4.3.- Fungotoxicidad "in vitro"

Los resultados obtenidos en el análisis de fungotoxicidad se muestran en la tabla 34. A las dosis empleadas en campo, sólo producen la muerte del hongo los fungicidas **carbendazima**, **imazalil**, **hexaconazol** y **tiabendazol**.

FUNGICIDAS	DE ₅₀ (ppm)		CMI (ppm)	
	Crecimiento miceliar	Formación colonias	Crecimiento miceliar	Formación colonias
Bitertanol	5	1	> 100	> 100
Carbendazima	-	-	10	10
Hexaconazol	5	10	20	20
Imazalil	1	1	10	10
Propiconazol	0,5	2	> 100	10
"Terlaí"	100	-	> 200	-
Tiabendazol	-	-	2	2

TABLA 34.- Efectividad de fungicidas frente a formación de colonias y crecimiento miceliar de *Fusarium* spp.

DE₅₀ = Dosis efectiva al 50%. CMI = Concentración Mínima Inhibitoria

Bitertanol presenta alta CMI frente a *Fusarium* spp., mientras que inhibe a dosis bajas a la especie de *Colletotrichum* aislada en Huelva (Tabla 24), ocurriendo lo mismo cuando se enfrentan a **propiconazol**. "**Terlaí**" se encuentra en un caso similar pero presenta alta DE₅₀. Tanto **hexaconazol** como **imazalil** procuran el control de ambos hongos. **Carbendazima** y **tiabendazol** muestran en este caso baja CMI.

3.6.4.4.- Influencia en campo

En los muestreos previos a la plantación, llevados a cabo en los dos primeros años de cultivo, se detectó *Fusarium* spp. en todas las muestras de suelo adherido a la planta, no observándose durante el último año. Cuando se realizan aislamientos de

tejidos internos de la corona se obtiene *Fusarium* spp. en un 12% de las muestras el primer año, en el segundo en un 15%, detectándose en el último en el 1% de las muestras. Existe la posibilidad de que la menor incidencia de ACR en los primeros años se deba a una cierta inhibición del proceso infectivo del patógeno.

Los resultados obtenidos en los aislamientos realizados al final de cada campaña se recogen en la tabla 35.

TRATAMIENTOS	1993 - 94		1994 - 95		1995 - 96		MDS ^z
	DR ^x	DT ^y	DR	DT	DR	DT	
TESTIGO NO INOCULADO	45	27,93 ^a	65	41,11 ^b	37,5	22,08 ^{b,c}	NS
TESTIGO INOCULADO	67,5	44,21 ^{a,b}	57,5	35,90 ^{a,b}	25	14,25 ^{a,b,c}	22.31
HEXACONAZOL	50	35,97 ^{a,b}	45	27,66 ^{a,b}	22,5	12,90 ^{a,b}	NS
PROPICONAZOL	72,5	47,93 ^{a,b}	77,5	51,82 ^b	50	30,59 ^c	21.58
TIABENDAZOL	40	23,79 ^a	55	33,72 ^{a,b}	20	11,81 ^{a,b}	18.01
IMAZALIL	75	54,22 ^b	67,5	43,00 ^b	27,5	16,45 ^{a,b,c}	29.97
TERLAÍ	40	24,80 ^a	55	34,65 ^{a,b}	32,5	19,20 ^{a,b,c}	NS
CARBENDAZIMA	40	25,00 ^a	27,50	15,88 ^a	7,5	4,31 ^a	21.42
BITERTANOL	47,5	28,70 ^a	75	49,36 ^b	22,5	13,30 ^{a,b,c}	18.83
HIPOCLORITO SÓDICO	72,5	47,93 ^{a,b}	67,5	44,44 ^b	35	21,96 ^{b,c}	NS
MDS (p)		26,35 (0,05)		25,75 (0,01)		18,70 (0,05)	

TABLA 35.- Efecto de los tratamientos en la recuperación de *Fusarium* spp. de tejidos de corona de fresa.

^x DR = datos reales, porcentaje de plantas de las que se aísla *Fusarium* spp..

^y DT = datos transformados angularmente

^z MDS (0,05) = Mínima Diferencia Significativa entre años.

Al final de todos los períodos de observación se aprecia un incremento del porcentaje de plantas de las que se aísla *Fusarium* spp., con respecto al detectado antes

de la plantación. En el último año los porcentajes son inferiores con respecto a los anteriores, aunque de forma no significativa en algunos tratamientos

Durante el primer año no se observan diferencias significativas debidas a tratamientos o a la presencia del patógeno. En 1994 y 1995 el tratamiento con **carbendazima** disminuye significativamente los porcentajes con respecto al control, siendo este uno de los que origina una menor incidencia de muerte de plantas por ACR.

Ninguno de los tratamientos que a las dosis empleadas en campo provocan la muerte de *Fusarium* spp. "in vitro", eliminan a dicho hongo de los tejidos internos de la corona.

5.- CONCLUSIONES

1.- Se detecta por primera vez en España localizado en la provincia de Huelva, *C. acutatum* como agente causal de antracnosis en fresa.

2.- La sintomatología desarrollada por *C. acutatum* en los cultivares utilizados responde a la descrita por otros autores, diferenciándose sólo en la correspondiente a la superficie foliar y raíces.

3.- La utilización de anticuerpos monoclonales es eficaz para determinar si un hongo pertenece al género *Colletotrichum* y concretamente a la especie *C. acutatum*.

4.- El conjunto de las características estudiadas, de forma independiente, no permiten encuadrar a un hongo del género *Colletotrichum* dentro de una u otra especie.

5.- Las condiciones climáticas de la provincia de Huelva favorecen la ocurrencia de antracnosis en fresa así como su desarrollo epifítico.

6.- La muerte de plantas por ACR, en campos de producción de fruto de fresa en la provincia de Huelva, sólo se produce en plantas infectadas antes de la plantación.

7.- Las mayores incidencias de podredumbres de fruto se originan en períodos de lluvia seguidos de aumento de las temperaturas.

8.- No existe relación entre alta incidencia de podredumbres de fruto y muerte de plantas por ACR en los últimos meses de producción.

9.- Cuando se utiliza stock de plantas infectadas procedentes de viveros aumenta de forma significativa la incidencia de podredumbres de frutos.

10.- Los rendimientos de cosecha disminuyen al aumentar la incidencia de ACR y podredumbres de frutos.

11.- El agente causal de la antracnosis en la provincia de Huelva, no debe ser considerado patógeno de suelo y sólo está presente en la rizosfera de las plantas que

han sufrido ACR o de aquellas asintomáticas de las que se recupera el patógeno.

12.- El arándano podría actuar como huésped intermediario del agente causal de antracnosis en fresa en la provincia de Huelva.

13.- Algunos de los fungicidas utilizados para el control de ACR sólo fueron parcialmente eficaces, considerándose como un método complementario en las actuaciones para el control de la enfermedad.

14.- Los tratamientos fungicidas utilizados no reducen significativamente la incidencia de podredumbres de fruto.

15.- Existen cultivares resistentes al *Colletotrichum acutatum* detectado en la zona de cultivo.

16.- Considerando la posible aparición de nuevas especies de *Colletotrichum* en la provincia de Huelva y la variabilidad de respuesta de los cultivares a los distintos aislados del patógeno no parece adecuado decantarse por la utilización mayoritaria de ninguno de ellos.

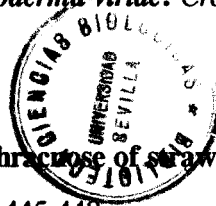
17.- Los tratamientos térmicos como método de control de ACR son eficaces pero reducen el vigor de las plantas tratadas.

18.- No se ha detectado en el medio natural un micro-organismo que actúe como competidor del agente causal de antracnosis.

19.- La planta de fresa parece ser la única fuente de inóculo para las distintas manifestaciones de la antracnosis, el agente causal se mantiene como infección latente en los tejidos de corona, produciendo infecciones en fruto. Para eliminar esta enfermedad se ha de contar, para establecer los campos de producción de fruto, con plantas sanas libres del patógeno.

6.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Anónimo. Anuario de Estadísticas Agrarias y Pesqueras, 1994. 332 pp. Ed. Junta de Andalucía.
- 2.- Anónimo. Boletín Oficial del Estado , nº 56, 1996. pp 8594 - 8595
- 3.- Arcos García, A., 1991. **Principales factores de la producción del fresón.** *Hortofruticultura* Año II, nº 1: 28-35.
- 4.- Bankole, S.A. y Adebajo, A., 1996. **Biocontrol of brown blotch of cowpea caused by *Colletotrichum truncatum* with *Trichoderma viride*.** *Crop Protection* 15: 633-636.
- 5.- Beraha, L. & Wright, W.R., 1973. **A new anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum dematium*.** *Plant. Dis. Rep.* 57: 445-448.
- 6.- Blakeman, J.P. & Hornby, D., 1966. **The persistence of *Colletotrichum coccodes* and *Mycosphaerella ligulicola* in soil, with special reference to sclerotia and conidia.** *Trans. Br. Mycol. Soc.* 49: 227-240.
- 7.- Bonde, M.R., Peterson, G.L. & Maas, J.L., 1991. **Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry.** *Phytopathology* 81: 1523-1528.
- 8.- Boudreau, M.A. & Madden, L.V., 1995. **Effect of strawberry density on dispersal of *Colletotrichum acutatum* by simulated rain.** *Phytopathology* 85: 934-941.
- 9.- Bringhurst, R.S. & Voth, V. , 1980. **Six new strawberry varieties released.** *California Agriculture* Feb: 12-15.
- 10.- Brooks, A.N., 1931. **Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*, N.Sp.** *Phytopathology* 21: 739-744.



- 11.- Brooks, A.N., 1935. **Anthracnose and wilt of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae***. *Phytopathology* 25: 973-974 (Abstract).
- 12.- Buchner, R.P., 1991. **Hot water preplant dip for strawberry disease control**. *The Strawberry into the 21st Century*, Ed. Adam Dale y James J. Luby. pp. 217 - 218
- 13.- Buddie, A.G., Martinez-Culebras, P., Bridge, P.D., García, M.D., Querol, A., Cannon, P.F. & Monte, E. (en prensa). **Molecular characterization of *Colletotrichum* strains derived from strawberry**.
- 14.- Carvalho, C.T. & Cardoso, C.O., 1964. **Nota sobre antracnose dos estoloes e podridao do rizoma de morangueiros, causada por *Colletotrichum fragariae* B.** *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"* 21: 275-278.
- 15.- Carver, R.B. & Horn, N.L., 1960. **Summer killing of strawberry plants caused by *Colletotrichum fragariae***. *Phytopathology* 50: 575. (Abstr.)
- 16.- Chandler, C.K., 1991. **North American strawberry cultivars**. *The Strawberry into the 21st Century*, Ed. Adam Dale y James J. Luby. pp. 60 - 65.
- 17.- Cook, T.A., Barker, I., Brewer, S., Crossley, S., Freeman, S. & Lane, C., 1995. **Detection of strawberry black spot (*Colletotrichum acutatum*) with monoclonal antibodies**. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 25: 57-63.
- 18.- Delp, B.R. & Milholland, R.D., 1980 a. **Control of strawberry anthracnose with captafol**. *Plant Disease* 64: 1013-1015.
- 19.- Delp, B.R. & Milholland, R.D., 1980 b. **Evaluating strawberry plants for resistance to *Colletotrichum fragariae***. *Plant Disease* 64: 1071-1073.
- 20.- Delp, B.R. & Milholland, R.D., 1981. **Susceptibility of strawberry cultivars and related species to *Colletotrichum fragariae***. *Plant Disease* 65: 421-423

- 21.- Denoyés-Rothan, B. & Baudry, A., 1995. **Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristic.** *Phytopathology* 85: 53-57.
- 22.- Denoyés-Rothan, B., Guerin, G., Nourrisseau, J.G., Morzieres, J.P., Baudry, A., Lesgourgues, D. & Clerjeau, M., 1996. **Situation de l'antracnose du fraisier en France.** *PHM Revue Horticole* 371: 23-27.
- 23.- Dickman, M.B., Patil, S.S. & Kolattukudy, P.E., 1983. **Effects of organophosphorous pesticides on cutinase activity and infection of papayas by *Colletotrichum gloeosporioides*.** *Phytopathology* 73: 1209-1214.
- 24.- Dyko, B.J. & Mordue, J.E.M., 1979. **Description of pathogenic fungi and bacteria.** C.M.I. , n° 630.
- 25.- Durner, E.F., Barden, J.A., Himelrick, D.G. & Poling, E.B., 1984. **Photoperiod and temperature effects on flower and runner development in day-neutral, junebearing and everbearing strawberries.** *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 396-400.
- 26.- Eastburn, D.M. & Gubler, W.D., 1990. **Strawberry anthracnose: Detection and survival of *Colletotrichum acutatum* in soil.** *Plant Disease* 74: 161-163.
- 27.- Eastburn, D.M. & Gubler, W.D., 1992. **Effects of soil moisture and temperature on the survival of *Colletotrichum acutatum*.** *Plant Disease* 76: 841-842.
- 28.- Ellis, M.A. & Bulger, M.A., 1986. **Anthracnose fruit rot (*Colletotrichum gloeosporioides*) of strawberry in Ohio.** *Plant Disease*. 70: 475 (Abstract).
- 29.- Faedi, W., Bagnara, G.L., Turci, P., Winterbottom, C.Q. & De Clauser, R., 1991. **Screening for strawberry resistance to *Colletotrichum acutatum*.** *Proceedings from International Workshop: Strawberry diseases and breeding for varietal resistance. Bordeaux (Francia).*

- 30.- Farley, J.D., 1976. **Survival of *Colletotrichum coccodes* in soil.** *Phytopathology* 66: 640-641.
- 31.- Ferraz, J.F.P., 1977. **Morfologia, comportamento cultural e patogenicidade de espécies de *Colletotrichum* e *Gloeosporium*.** *Agronomia lusit.* 38 (2): 163-179.
- 32.- Figueiredo, P., Bastos Cruz, B.P., Oliveira, D.A. & Camargo, L.S., 1972. **Resistencia de cultivares de morangueiro a antracnose causada por *Colletotrichum fragariae* Brooks.** *Arquivos do Inst. Biol. S. Paulo* 39 (2): 63-68
- 33.- Freeman, S. & Nizani, Y., 1997. **Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse, and field conditions.** *Plant Disease* 81: 749-752.
- 34.- García-Jimenez, J., Del Cañizo Perate, J.A. & Alfaro García, A., 1983. **Una antracnosis del fresón en España.** *Resúmenes de las Comunicaciones presentadas a las IV, V y VI Reuniones Anuales del Grupo Especializado de Fitopatología Microbiana de la Sociedad Española de Microbiología.* Ed. I.N.I.A. pp. 64-65.
- 35.- Gubler, W.D., Gunnell, P.S., Welch, N.C. & Buchner, R., 1988. **Strawberry diseases and control.** Annual Report of Strawberry Research. California Strawberry Advisory Board. pp. 12-36.
- 36.- Gubler, W.D. & Gunnell, P.S., 1991. **Taxonomy of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry.** *The Strawberry into the 21st Century, Ed. Adam Dale y James J. Luby.* pp. 191 - 194.
- 37.- Gullino, M.L., Romano, M.L. & Garibaldi, A., 1985. **Identification and response to fungicides of *Colletotrichum gloeosporioides*, incitant of strawberry black rot in Italy.** *Plant Disease* 69:608-609
- 38.- Gupton, C.L. & Smith, B.J., 1991. **Inheritance of resistance to *Colletotrichum* species in strawberry.** *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 724-727.

- 39.- Henz, G.P., Boiteux, L.S. & Lopes, C.A., 1992. **Outbreak of strawberry caused by *Colletotrichum acutatum* in Central Brazil.** *Plant Disease*,, 76: 212 (Abstract).
- 40.- Horn, N.L., Burnside, K.R., & Carver, R.B., 1972. **Control of the crown rot phase of strawberry anthracnose through sanitation, breeding for resistance, and benomyl.** *Plant. Dis. Rep.* 56: 515-519.
- 41.- Horn, N.L. & Carver, R.G., 1962. **Anthracnose and powdery mildew on strawberry plants in Louisiana.** *Plant Disease Rep.* 45: 591-592.
- 42.- Horn, N.L & Carver, R.G., 1963. **A new crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*.** *Phytopathology* 53: 768-770.
- 43.- Horn, N.L. & Carver, R.B., 1968. **Overwintering of *Colletotrichum fragariae* in strawberry crowns.** *Phytopathology* 58:540-541.
- 44.- Howard, C.M., 1971. **Control of strawberry anthracnose with benomyl.** *Plant. Dis. Rep.*, 55: 139-141.
- 45.- Howard, C.M., 1972. **A strawberry fruit rot caused by *Colletotrichum fragariae*.** *Phytopathology* 62: 600-602
- 46.- Howard, C.M. & Albrechts, E.E., 1973. ***Cassia obtusifolia*, a possible reservoir for inoculum of *Colletotrichum fragariae*.** *Phytopathology* 63: 533-534.
- 47.- Howard, C.M. & Albrechts, E.E., 1983. **Black leaf spot phase of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (= *C. fragariae*).** *Plant Disease* 67: 1144-1146.
- 48.- Howard, C.M. & Albrechts, E.E., 1984 a. **Anthracnose of strawberry fruit caused by *Glomerella cingulata* in Florida.** *Plant Disease* 68: 824-825.

- 49.- Howard, C.M. & Albregts, E.E., 1984 b. **Anthracnose**. *Compendium of strawberry diseases*. J.L. Mass, ed. American Phytopathological Soc, St. Paul, MN. pp. 85-87
- 50.- Howard, C.M., Chandler, C.K. & Albregts, E.E., 1991. **Strawberry anthracnose in Florida**. *The Strawberry into the 21st Century*, Ed. Adam Dale y James J. Luby. pp. 219 -220
- 51.- Howard, C.M., Maas, J.L., Chandler, C.K. & Albregts, E.E., 1992. **Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida**. *Plant Disease* 76: 976-981.
- 52.- Hughes, K.J.D., Lane, C.R. & Cook, R.T.A., 1996. **Development of a rapid method for the detection and identification of *C. acutatum***. *Proceedings from 4th International Simposium: Diagnosis and identification of plant pathogens*. Bonn (Alemania).
- 53.- Jeffries, P., Dodd, J.C., Jeger, M.J. & Plumbley, R.A., 1990. **The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops**. *Plant Pathology* 39: 343-366.
- 54.- Jeffries, P y Koomen, I., 1992. **Strategies and prospects for biological control of diseases caused by *Colletotrichum***. *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Ed. J.A. Bailey y M.J. Jeger. pp 337 - 357.
- 55.- Juscafresa, B e Ibar, L., 1987. **Fresas y fresones**. 171 pp. Ed. Aedos
- 56.- Kaufmann, P.J. y Weidemann, G.J., 1996. **Isozyme analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* from five host genera**. *Plant Dis.* 80: 1289-1293
- 57.- Koomen, I. & Jeffries, P., 1993. **Effects of antagonistic microorganisms on the post-harvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango**. *Plant Pathology* 42: 230-237.

- 58.- LaMondia, J.A., 1991. **First report of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* in Connecticut.** *Plant Disease* 75: 1286 (Abstract).
- 59.- Maas, J.L., 1978. **Anthracnose of strawberry fruit in Maryland.** *Plant. Dis. Rep.* 62: 488-492.
- 60.- Maas, J.L., 1983. **Pathogenicity and gel electrophoretic protein pattern comparisons among strawberry anthracnose fungi.** *Phytopathology* 73: 843 (Abstract).
- 61.- Maas, J.L. & Galletta, G.J., 1989. **Germplasm evaluation for resistance to fungus-incited diseases.** *Acta Horticulturae* 265: 461-472.
- 62.- Maas, J.L. & Howard, C.M., 1985. **Variation of several anthracnose fungi in virulence to strawberry and apple.** *Plant Disease* 69: 164-166.
- 63.- Madden, L.V., 1983. **Measuring and modeling crop losses at the field level.** *Phytopathology* 73: 1591-1596.
- 64.- Maroto, J.V. y Lopez Galarza, S., 1988. **Producción de fresas y fresones.** 107 pp. Ed. Mundi-Prensa.
- 65.- Masel, A.M., Irwin, J.A.G. y Manners, J.M., 1993. **Mini-chromosomes of *Colletotrichum* spp. infecting several host species in various countries.** *Mycol. Res.* 97: 852-856.
- 66.- McGechan, J.K., 1977. **Black spot of strawberry.** *Agricultural Gaz. of New South Wales* 88: 26-27.
- 67.- McInnes, T.B., Black, L.L. & Gatti, J.M., 1992. **Disease-free plants for management of strawberry anthracnose crown rot.** *Plant Disease* 76: 260-264.
- 68.- Micales, J.A., Bonde, M.R., & Peterson, G.L., 1986. **The use of isozyme**

analysis in fungal taxonomy and genetics. *Mycotaxon* 27: 405-449.

69.- Milholland, R.D., 1982. **Histopathology of strawberry infected with *Colletotrichum fragariae***. *Phytopathology* 72: 1434-1439.

70.- Milholland, R.D., 1995. **Antracnosis fruit rot (Ripe Rot)**. *Compendium of Blueberry and Cranberry Diseases*. Ed. F.L. Caruso y D.C. Ramsdell. pp 17.

71.- Miller, P.M. & Stoddard, E.M., 1956. **Hot-water treatment of fungi infecting strawberry roots**. *Phytopathology* 46: 694-696.

72.- Müller, E. y Loeffler, W., 1976. **Micología**. 345 pp. Ed. Omega.

73.- Nair, J., Newhook, F.J. & Corbin, J.B., 1983. **Survival of *Colletotrichum acutatum* f.sp. *pinea* in soil and pine debris**. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81: 53-63.

74.- Neely, D. & Himelick, E.B., 1966. **Simultaneous determination of fungistatic and fungicidal properties of chemicals**. *Phytopathology*, 56: 203-209.

75.- Nemeje, P.S., Moore, D. & Prior, C., 1990. **Potential of the parasitoid *Heterospilus prosopidis* (Hymenoptera: Braconidae) as a vector of plant-pathogenic *Colletotrichum* spp.**. *Ann. Appl. Biol.* 116: 11-19.

76.- Okayama, K., 1991. **Occurrence and control of strawberry anthracnose in Japan**. *Proceeding from International Workshop: Strawberry diseases and breeding for varietal resistance. Bordeaux (Francia)*.

77.- Paterson, R.R.M. & Bridge, P.D., 1994. **Biochemical techniques for filamentous fungi**. Ed. International Mycological Institute Technical Handbooks, n° 1. pp 123

78.- Perez Alfonso, J.L., 1979. **Cultivo de fresas**. Publicaciones de Extensión Agraria. Serie M.T. n° 49.

- 79.- Plakidas, A.G., 1964. **Anthracnose strawberry diseases**. Ed. Louisiana State Univ. Studies Biol. Sci. Series nº 5.
- 80.- Raid, R.N. & Pennypacker, S.P., 1987. **Weeds as hosts for *Colletotrichum coccodes***. *Plant Disease* 11: 71:643-646.
- 81.- Roudeillac, Ph. y Veschambre, D., 1987. **La fraise. Techniques de production**. pp. 384. Ed. Ctifl.
- 82.- Salas Arce, J. y Dominguez Flores, A., 1985. **Cultivo del fresón en la costa de Huelva**. Ed. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca (D.G.I.E.A.). Serie Monografías, 1. pp 127
- 83.- Small, W., 1926. **On the occurrences of a species of *Colletotrichum***. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 11: 112-137
- 84.- Santos G^a de Paredes, B. y Romero Muñoz, F., 1995. **Caracterización y control de la antracnosis de la fresa en el S.O. de Andalucía (España)**. *Revista Forestal Venezolana* Vol. I, nº 1. (Resúmenes: VII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Mérida (Venezuela)).
- 85.- Simmonds, J.H., 1965. **A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland**. *Queensland J. of Agric. & Animal Sciences* 22: 437-459.
- 86.- Simmonds, J.H., 1968. **Type specimens of *Colletotrichum gloeosporioides* var. *minor* and *Colletotrichum acutatum***. *Queensland J. Agric. Anim. Sci* 25: 178.
- 87.- Smith, B.J., 1986. **First report of *Colletotrichum acutatum* on strawberry in the United States**. *Plant Disease* 70: 1074 (Abstract).
- 88.- Smith, B.J., 1987. **Effect of nitrogen, phosphorus and potassium on the severity of strawberry anthracnose-crown rot**. *Phytopathology* 77: 1691 (Abstract)

- 89.- Smith, B.J. & Black, L.L., 1987. **Resistance of strawberry plants to *Colletotrichum fragariae* affected by environmental conditions.** *Plant Disease* 71: 834-837.
- 90.- Smith, B.J., Black, L.L. & Galletta, G.J., 1990 a. **Resistance to *Colletotrichum fragariae* in strawberry affected by seedling age and inoculation method.** *Plant Disease* 74: 1016-1021.
- 91.- Smith, B.J. & Black, L.L., 1990 b. **Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry.** *Plant Disease* 74: 69-76.
- 92.- Smith, B.J. & Black, L.L., 1991. **Greenhouse efficacy of fungicides for control of anthracnose crown rot of strawberry.** *The Strawberry into the 21st Century*, Ed. Adam Dale y James J. Luby. pp. 221 - 226.
- 93.- Smith, B.J. & Spiers, J.M., 1982. **Evaluating techniques for screening strawberry seedlings for resistance to *Colletotrichum fragariae*.** *Plant Disease* 66: 559-561.
- 94.- Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E. & Mills, P.R., 1992. **DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose.** *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 265-281.
- 95.- Steel, G.D. y Torrie, J.H., 1985. *Bioestadística: Principios y procedimientos.* 2ª Edición. Ed. Mc Graw-Hill Latinoamericana, S.A., 662 pp.
- 96.- Sturgess, O.W., 1954. **A strawberry ripe fruit rot.** *Queensland Agric. Journal* 78: 269-270.
- 97.- Sturgess, O.W., 1957. **A ripe fruit rot of strawberry caused by a species of *Gloeosporium*.** *Queensland J. Agric. Sci.* 14: 241-251.

- 98.- Sutton, B.C., 1962. *Colletotrichum dematium* (Pers. Ex Fr.) Grove and *C. trichellum* (Fr. Ex Fr.) Duke. *Trans. Br. Mycol. Soc* 45: 222-232.
- 99.- Sutton, B.C., 1980. **The Coleomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli y stromata.** Ed. *Commonwealth Mycological Institute*. 696 pp.
- 100.- Sutton, B.C., 1992. **The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*.** *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Ed. J.A. Bailey y M.J. Jeger. pp 1 - 27.
- 101.- Tello, J., Vares, F. y Lacasa, A., 1991. **Análisis de muestras.** *Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos*. Ed. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. pp: 39-73.
- 102.- Tuite, J., 1969. *Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria*. *Burgess Publishing Company*. 238 pp
- 103.- Veschambre, D., 1977. **La culture du fraiser sous plastique.** Ed. *Invuflec*.
- 104.- Von Arx, J.A., 1957. **Die arten der gattung *Colletotrichum* Cda.** *Phytopathol.Z.* 29: 413-468
- 105.- Von Arx, J.A., 1981. **The genera of fungi sporulating in pure culture.** 3rd edn. *J. Cramer, Vaduz*.
- 106.- Walker, J., Nikandrow, A. y Millar, G.D., 1991. **Species of *Colletotrichum* and *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in the genus *Colletotrichum*.** *Mycological Research*. 95: 1175-1193.
- 107.- White, P.R., 1927. **Studies of the physiological anatomy of the strawberry.** *Journal of Agricultural Research* 35: 481- 492.
- 108.- Wilson, L.L., Madden, L.V. y Ellis, M.A., 1990. **Influence of temperature**

and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*. 80: 111-116.

109.- Wilson, L.L, Madden, L.V. y Ellis, M.A., 1992. Overwinter survival of *Colletotrichum acutatum* in infected strawberry fruit in Ohio. *Plant Disease* 76: 948-950.

110.- Wright, W.R., Smith, M.A., Ramsey, G.B. y Beraha, L., 1960. *Gloeosporium* rot of strawberry fruit. *Plant Dis. Rep.* 44: 212-213.

111.- Yang, X., Madden, L.V., Wilson, L.L y Ellis, M.A., 1990 a. Rain splash dispersal of *Colletotrichum acutatum* from infected strawberry fruit. *Phytopathology* 80: 590-595.

112.- Yang, X., Madden, L.V., Wilson, L.L & Ellis, M.A., 1990 b. Effects of surface topography and rain intensity on splash dispersal of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 80: 1115-1120.

113.- Yang, X.B., & TeBeest, D.O., 1992. Green treefrogs as vectors of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Disease* 76: 1266-1269.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

600672293



ña BERTA DE LOS SANTOS GARCIA DE PAREDES
 Estudio epifitótico, posibilidades de control de
 la antracnosis de fresa en el SO de Andalucía. Criterios
 morfológicos, culturales, bioquímicos y patogénicos en la
 causalización del agente causal.

16 APTO CUM LAUDE
 98

~~[Signature]~~
 B. Valde-

~~[Signature]~~
 [Signature]

[Signature]
 [Signature]

M. Doctorado

~~[Signature]~~