



Patogenia de *Olpidium bornovanus* en sandía

DIRECTORES

Julio Gómez Vázquez
Julio César Tello Marquina

ALUMNA

María Luísa Guirado Moya

NOVIEMBRE 2012

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer el apoyo y cordialidad recibidos desde el primer día por todos los compañeros de los distintos departamentos del centro IFAPA de La Mojonera durante, no sólo el período de la realización de este trabajo, si no durante todos los años que he pasado allí: Pilar Lorenzo, Evangelina, M^a Cruz, M^a Luz, M^a Ángeles, Juani, Emilio, Leticia, Dirk, Antonia, Antonio Paredes, Pari, Asun, Rafa y Jordi.

A mis compañeros del Departamento de Micología durante todo este tiempo: José Ramón Montoya, Antonio Álvarez, Rafael Martínez, Juan Manuel Rodríguez, David Iqan Martínez., ellos siempre me han aportado nuevas cosas y diferentes maneras de entender el trabajo.

A Josefina Ros Orta, “Fina”, por su apoyo continuo, sus siempre valiosos consejos para facilitar el trabajo, por su disposición para ayudar y como no, por su amistad.

A Yolanda Serrano, mi última compañera con la que he compartido trabajo, despacho pero también logros, decepciones, ilusión y confianzas. Gracias por ser una excepcional compañera en el completo sentido de la palabra.

A Marisa Aguilar, la primera compañera que tuve en esto de la patología, con la que aprendí muchísimas cosas totalmente nuevas para mí, la persona que me enseñó a trabajar en equipo haciéndome ver lo importante que es esto para la consecución de un buen trabajo, a “pararme a pensar”, a realizar “labor de pasillo”. Pero sobre todo, la que me contagió la ilusión por la patología. Siempre me apoyó de manera incondicional en cualquier empresa que emprendiera y hoy sigue estando ahí cada vez que la necesito, GRACIAS AMIGA.

Al Dr. Javier Tello, por su incansable dedicación, ilusión, y trabajo en la docencia e investigación de hongos fitopatógenos y transmitir todo esto de manera ejemplar tanto a sus colegas como a todos los que hemos sido alumnos suyos, a los que sus clases nos parecían, por que lo eran, magistrales.

A Julio Gómez, la persona que me ha enseñado TODO lo que sé, sobre patología vegetal, que me ha transmitido la disciplina del trabajo bien hecho y la pasión por el mundo de la Patología Vegetal. Gracias por su infinita paciencia para explicar siempre todas las preguntas, las dudas, los conceptos que para mí eran bastante difíciles de entender, las explicaciones de la morfología de los hongos, el concepto de enfermedad...y tantas y tantas cosas. Y también muchas gracias por el último ejercicio de paciencia realizado al esperar la presentación de este trabajo durante tanto tiempo.

Indudablemente a mi familia, a mis padres que toda su vida han trabajado incansablemente para que sus hijos tengan la preparación académica que ellos no han podido tener. A mi madre que sigue cuidando de sus nietos para que su hija pueda seguir “trabajando y estudiando”. A mis hermanos, a Jorge porque de vez en cuando se tiene que ocupar de sus sobrinos, a Gabi y Mila que siempre están dispuestos a echarme una mano en lo que sea, y pendientes de mis cosas. También a mis cuñados, Antonio y María José, que siempre están encantados de cuidar de sus sobrinos.

Por supuesto, a José, que ha tenido hacer cenas, duchar niños y pasar mucho tiempo libre solo con sus hijos, porque yo he tenido que estar estudiando, en clase, haciendo prácticas, redactando este trabajo...GRACIAS POR TODOS ESTOS AÑOS DE PACIENCIA Y COMPRENSIÓN.

A mis hijos José Manuel y Ana, porque son dos niños maravillosos, que me han regalado los mejores momentos de mi vida. Ellos son los que realmente han sufrido las horas de ausencia de su madre. Sólo me queda pedirles comprensión y decirles que siempre estaré cuando me necesiten, OS QUIERO.

Indudablemente, a mi padre

ÍNDICE

1. INTERÉS Y OBJETIVOS	7
1.2. Interés y valoración del problema	7
1.2. Objetivo del trabajo	10
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. El hospedador: la sandía	11
2.1.1. Generalidades de la especie	11
2.1.2. Cultivo de la sandía en el sureste peninsular.	12
2.1.3. Cultivo sin suelo de sandía.....	17
2.1.4. Enfermedades de la sandía causadas por hongos de suelo.....	19
2.1.4.1. Damping-off.....	19
2.1.4.2. Podredumbre de las raíces y de la base del tallo causada por <i>Pythium aphanidermatum</i>	21
2.1.4.3. La fusariosis vascular de la sandía.	22
2.1.4.4. Necrosis radicular causada por <i>Olpidium bornovanus</i>	23
2.1.5. El colapso o muerte súbita de la sandía	25
2.1.5.1. El “colapso de la sandía” causado por <i>Monosporascus cannonballus</i> . .	25
2.1.5.2. Acremoniosis: el colapso de la sandía causado por <i>Acremonium cucurbitacearum</i>	29
2.1.5.3. El colapso causado por el <i>Virus de las Manchas Necróticas del Melón</i> (MNSV).	33
2.1.5.4. Colapso de la sandía de etiología desconocida.	36
2.2- El binomio <i>Olpidium bornovanus</i> /MNSV.....	39
2.2.1- Características generales del género <i>Olpidium</i>	39
2.2.2. La especie <i>Olpidium bornovanus</i> (= <i>O. radiale</i> , <i>O. cucurbitacearum</i>)	41
2.2.3. Virosis transmitidas por las diferentes especies de <i>Olpidium</i> . El Virus de las Manchas Necróticas del Melón y su interacción con <i>Olpidium bornovanus</i>	46
2.2.4. La enfermedad causada por MNSV y su control.	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.1. Análisis de semillas.....	57
3.2. Realización del semillero.	59
3.3. Obtención del inóculo e inoculación de los experimentos.....	60
3.4. Generales de los experimentos de inoculación	63
3.4.1. Características del invernadero.	64
3.4.2. Tipo de cultivo y sistema de riego.	65
3.4.3. Detección de <i>Olpidium bornovanus</i> y MNSV.	66
3.4.4. Toma de datos y análisis.	67
3.5. De cada experimento.....	69

3.5.1. Primer experimento	69
3.5.2. Segundo experimento.....	70
3.5.3. Tercer experimento	71
4. RESULTADOS	72
4.1. De los análisis de semillas.....	72
4.2. De los experimentos de patogeneicidad.....	72
4.2.1. Primer experimento	72
4.2.2. Segundo experimento.....	75
4.2.3. Tercer experimento	79
5. DISCUSIÓN	84
6. CONCLUSIONES	89
7.- BIBLIOGRAFÍA	90

1. INTERÉS Y OBJETIVOS

1.2. Interés y valoración del problema

La producción de sandía en España en 2009 alcanzó las 851.976 toneladas, con una superficie cultivada total de 18.000 hectáreas, alcanzando un valor de mercado de 196 millones de euros, poco menos de la mitad del total de la producción fue destinada a la exportación. En Almería la superficie dedicada a este cultivo bajo invernadero en 2009 fue de unas 4.000 ha, lo que supone más del 60% de la superficie total que en el país se dedica al cultivo protegido de sandía. La producción obtenida llegó a suponer más del 45% de la producción nacional, siendo la primera provincia productora de sandía de España con un total de 389.760 toneladas (MARM, 2010).

En Almería la recolección se realiza principalmente durante el período comprendido entre abril y junio adelantándose al resto de España y obteniendo así una mayor rentabilidad. Tras esta provincia, es la Comunidad Valenciana la de mayor importancia en cuanto a producción de sandía siendo el cultivo de verano por excelencia en esta comunidad, seguida de Murcia dónde hace pocos años que se ha comenzado a cultivar. En España hay zonas de cultivo tradicional de sandía en secano que actualmente están disminuyendo debido a la implantación del riego localizado, este es el caso de provincias como Toledo (Maroto *et al*, 2002).

Desde hace más de 20 años, los cultivos de sandía y melón de todo el mundo se ven afectados por un síndrome denominado colapso, muerte súbita o marchitamiento de los tallos (“vine decline”). El síntoma más característico es un marchitamiento repentino de las plantas y muerte de las mismas cuando está próximo el momento de recolección de los frutos, sin mostrar aparentemente ningún otro síntoma. Los agentes causales asociados a este síndrome varían dependiendo de las distintas zonas de cultivo, así el ascomiceto *Monosporascus cannonballus* ha sido asociado a este síndrome en España (Lobo, 1991).

Otro hongo, *Acremonium cucurbitacearum* ha sido asociado al colapso del melón y la sandía en España (García *et al*, 1989b; Armengol, 1998), Estados Unidos (Bruton *et al*, 1995; Bruton *et al*, 1996) y sólo al colapso del melón en Honduras (Bruton and Miller, 1997b).

En España, se ha citado a *Rhizoctonia solani* como agente causal del colapso del melón en la zona del Levante español (Cebolla y Campos, 1985; Cebolla *et al.*, 1990).

En Almería la muerte súbita del melón y la sandía empezó a observarse a primeros de los años 80. Los síntomas más característicos de la enfermedad fueron marchitez y muerte masiva y repentina de las plantas durante el período de maduración de los frutos sin que antes hubieran mostrado ningún síntoma de enfermedad. Las plantas enfermas presentaban necrosis seca del hipocotilo y necrosis generalizada del sistema radicular. Aunque, las primeras investigaciones asociaron este síndrome a hongos tales como *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* (Cuadrado y Gómez, 1984).

Poco después se comprobó que esta sintomatología era muy parecida a la que se observaba en los cultivos de melón, y que a su vez coincidían con los descritos en Grecia y Japón (Avgelis, 1985; Hibi y Furuki, 1985). Además, la detección en las plantas enfermas del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) (Luis, 1986, 1991) y la presencia de *Olpidium bornovanus* en un importante porcentaje de los invernaderos prospectados (Gómez *et al.*, 1990), hicieron que se planteara la hipótesis de que la enfermedad estuviese causada por MNSV.

Desde el inicio de los años 90, el empleo generalizado del injerto en sandía como solución a la fusariosis vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* enmascaró por completo esta enfermedad que también era controlada por el injerto (Gómez, com. pers.).

En trabajos posteriores, Cuadrado *et al.*, (1993), demostraron la patogeneicidad de MNSV sobre melón, tanto cuando fue inoculado mecánicamente sobre plantas sanas, como cuando lo fue a través del hongo vector *Olpidium bornovanus*, reproduciendo los síntomas de marchitez y muerte de plantas observados en campo. En estos trabajos dejan abierta la necesidad de estudio de la implicación de MNSV en la muerte súbita de la sandía, que en Almería presenta una sintomatología distinta a la descrita en Grecia por Avgelis en 1989.

El síndrome del colapso o muerte súbita de la sandía también ha sido descrito en otras zonas productivas del mundo como Israel, Túnez, USA y México, siendo el marchitamiento y muerte de las plantas pocos días antes de la recolección, el principal síntoma observado. Por este motivo los nombres comunes más utilizados para describir la enfermedad han sido: colapso, muerte súbita, vine decline (marchitez de los tallos) (Antignus *et al.*, 1997; Martyn *et al.*, 1994; Bruton *et al.*, 1995; Martyn *et al.*, 1996).

El síndrome de la muerte súbita de la sandía, ha sido reproducido inoculando aislados masales de *O. bornovanus* portadores del virus e inoculando el virus mecánicamente, aunque la sintomatología en ambos casos difirió en algunos aspectos (Guirado *et al.*, 2009a).

Además, en melón, se reprodujo dicho síndrome inoculando con aislados masales portadores de MNSV sobre la variedad Vital portadora del gen nsv/nsv, lo cual hizo sospechar de que *Olpidium bornovanus* pudiera ser patógeno por sí mismo, sin estar asociado a MNSV, ya que el virus no pareció interferir en este experimento al no ser la planta huésped del mismo (Gómez, 1993).

La capacidad patogénica de un aislado monoesporangial de *Olpidium bornovanus* no portador de MNSV sobre melón, ha sido demostrada causando pardeamiento generalizado de las raíces y reducción del crecimiento de las

plantas infectadas, aunque no ha reproducido el síndrome de muerte súbita (Stanghellini *et al.*, 2010)

1.2. Objetivo del trabajo

Con todos los antecedentes antes expuestos, el objetivo del presente trabajo fue comprobar la patogenia de diferentes aislados monoesporangiales de *Olpidium bornovanus* libres de MNSV en plantas de sandía cultivadas sobre sustrato de perlita, y comprobar su posible implicación en el colapso o muerte súbita.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El hospedador: la sandía

2.1.1. Generalidades de la especie

La sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.) es una planta anual que pertenece a la familia de las Cucurbitáceas. Sus tallos son herbáceos y rastreros muy vellosos y relucientes provistos de zarcillos caulinareos que le dan capacidad para trepar. Del cuello de la planta parten entre 5 y 6 ramas principales que dan lugar a las ramas secundarias (Serrano, 1996). Las hojas son pinnado partidas, divididas en 3-5 lóbulos redondeados, que a su vez también se componen de varios segmentos redondeados. En el haz, el limbo es liso mientras que el envés está cubierto de pilosidades (Camacho, 2003).

El sistema radicular es muy ramificado aunque la raíz principal alcanza mayor desarrollo que las secundarias (Serrano, 1996).

Es una planta monoica, con flores solitarias masculinas y femeninas que aparecen en las axilas de las hojas. La flor femenina posee un ovario ínfero que se distingue muy bien a simple vista. El cáliz es de color verde con sépalos libres y la corola está formada por cinco pétalos de color amarillo. La flor femenina aparece en brotes secundarios y terciarios. La polinización es entomófila (Camacho, 2003).

Los frutos son bayas globosas u oblongas en pepónide cuyo peso oscila entre los dos y los veinte kilos. El color de la corteza puede ser uniforme verde oscuro, verde claro o amarillo, o bien a franjas de colores amarillento, grisáceo, verde claro sobre fondo de diversas tonalidades verdes. La pulpa es de color rojo o rosado aunque hay variedades de pulpa amarilla (Camacho, 2003).

En cuanto a las exigencias climáticas, la sandía requiere un clima templado-cálido, aunque precisa menos temperatura que el melón y un poco más de humedad ambiental. Su desarrollo vegetativo se detiene por debajo de los 11-13°C, sufriendo helada por debajo de los 0°C. El óptimo vegetativo está comprendido entre 23-28°C, siendo la temperatura óptima de floración de 18-20°C. Conviene que la humedad ambiental esté comprendida entre el 60 y el 75% (Serrano, 1996).

La sandía es una planta exigente en luminosidad la cual influye en la floración y coloración final de los frutos, además para que la floración sea óptima, es necesario que la duración del día sea mayor de 12 horas. La época de cultivo en invernadero está comprendida desde enero hasta mediados de verano, realizándose la siembra en enero-febrero en las zonas de cultivo más cálidas y en febrero-marzo en las más frías (Serrano, 1996).

Prefiere suelos de consistencia silíceo-arcillosa, ligeros y fértiles, ricos en materia orgánica descompuesta. También es importante una óptima temperatura del suelo y que éste posea una elevada inercia térmica, con lo cual, los suelos enarenados son muy apropiados para este cultivo. El pH del suelo debe estar comprendido entre 6 y 7,4 (Serrano, 1996).

2.1.2. Cultivo de la sandía en el sureste peninsular.

La sandía en sus primeras fases de desarrollo es una planta de crecimiento rápido, si la temperatura es alta y no hay pico de bajas temperaturas nocturnas. Por tanto, en función de la época de siembra el manejo habrá de adecuarlo a las condiciones climáticas (Requena, 1999).

La temperatura óptima de siembra es de 25°C y no debería de descender de 15°C ni sobrepasar los 45°C cuando se hace siembra directa. Cuando se hace siembra en semillero es conveniente hacerlo en taco de lana de roca, ya que en otros medios no compactos el sistema radicular en general

es débil y no facilita el sacado del cepellón de la bandeja (p.e. relleno de perlita+vermiculita) (Requena, 1999).

La obtención de cosechas cada vez más precoces, debido a los elevados precios que las cosechas tempranas obtienen en el mercado, llevó en su momento a adelantar las fechas de siembra y plantación a los meses de noviembre - diciembre, fechas en que las temperaturas y la falta de luz son claramente adversas para el cultivo. Actualmente, la plantación en Almería se realiza desde mediados de noviembre hasta finales de marzo (Camacho, 2003), realizándose el cultivo en invernadero en toda España en el período comprendido entre enero y mediados de verano, aunque en las zonas más cálidas la siembra o plantación se hace en enero-febrero y en las más frías en los meses de febrero-marzo (Serrano, 1996).

La sandía se puede sembrar directamente en el suelo de cultivo, aunque en invernadero esto no es aconsejable y debe plantarse con cepellón de semillero, tanto injertada como sin injertar. En caso de ser planta injertada es importante que la zona de injerto quede por encima de la arena para evitar el franqueo de la variedad (Camacho, 2003). El marco de plantación es de 1,5 a 2 metros entre hileras y de 0,50 a 0,75 metros entre plantas. En plantas injertadas estas distancias pueden ser del doble (Serrano, 1996). En Almería los marcos más utilizados son el de 2x2 m o de 4x1, que dan una densidad de plantación de 2.500 plantas x ha⁻¹, y con los que se han obtenido producciones de entre 10 y 14 Kg x m⁻² (Camacho, 2003).

Las variedades de sandía que se cultivan actualmente en la horticultura protegida son híbridos F1 de gran uniformidad y productividad. En la mayoría de los casos se cultiva injertada, sobre híbridos interespecíficos de *Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata* que ofrecen resistencia a la fusariosis vascular y a *Verticillium* y tolerancia a *Pythium* y Nematodos (Camacho, 2003).

Actualmente existen unas sesenta y cinco variedades diferentes de sandía, de las cuales entre ocho y diez se cultivan en el Sureste Peninsular y que se pueden dividir en dos grupos:

- Variedades de corteza verde oscuro “tipo Sugar Baby”, de las cuales las más cultivadas en Almería son: Sweet Marvel (Syngenta Seeds), Resistent (Fitó), Red Moon (Nunhems) y Dulzura (Rijk Zwaan), estas variedades dan frutos de peso medio de unos 5 Kg y carne de color rojo.
- Variedades de corteza rayada “tipo Crimson”, de las que las más cultivadas son: Crimson sweet (Varias empresas) y Crisby (Nunhems) en cuanto a las diploides, mientras que de las triploides son: Reina de Corazones (Varias empresas), Iris (Ramiro Arnedo), Boston (Nunhems) y Esmerald (Hazera). Como polinizador se utiliza Sweet Marvel ya que posee una floración coincidente con todas ellas.

Actualmente se está produciendo un constante incremento en la demanda de la sandía triploide (sin semilla), muy apreciada en el mercado por esta característica, estas variedades son en su mayoría tipo Crimson en cuanto al color de piel. Dentro de estos grupos existen cultivares con semillas y sin semillas, de carne roja, amarilla o naranja (Camacho, 2003).

Todos estos cultivares se injertan sobre híbridos de *Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*, siendo los más utilizados RS-841, Brava, Patrón y Hércules, lo cual confiere a la sandía mayor resistencia tanto a las temperaturas bajas como a las elevadas, así como mayor rusticidad (Camacho, 2003).

El injerto utilizado con más frecuencia es el de aproximación, aunque también se utilizan el de hendidura, empalme, perforación lateral y cuña. El injerto de aproximación no requiere condiciones ambientales tan estrictas para su prendimiento como el de púa, pero sin embargo, este último tiene la ventaja de que no necesita manipulación posterior, mientras que el de

aproximación requiere el corte del tallo de la sandía (Camacho y Fernández, 1997).

Es muy importante en el injerto determinar la afinidad o incompatibilidad patrón-variedad, así como la producción precoz y el tamaño de los frutos. Camacho y Fernández (1997) determinan una excelente afinidad tanto en producción como en prendimiento entre las variedades Reina de Corazones, Boston y Tigre con los patrones de *Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata*: Rs-841, TZ-148, Brava y Shintoza. Además obtienen un peso medio de frutos entre 4,5 y 6 Kg de acuerdo con las exigencias comerciales de exportación.

La poda y el aclareo de frutos son labores poco utilizadas, la primera se utiliza para equilibrar el desarrollo de la planta y la segunda con el fin de conseguir un tamaño óptimo de frutos. Es conveniente dejar uno o dos frutos por rama principal, dependiendo de que la variedad sea de frutos voluminosos o frutos pequeños tipo Sugar Baby (Serrano, 1996).

El cuajado de los frutos se puede conseguir mediante hormonas, que utilizadas de forma correcta dan lugar a un mayor peso de frutos con rápido crecimiento de los mismos y pocas semillas (Serrano, 1996). La aplicación de 2,4- D a 8 ppm produce los mejores resultados en cuanto a producción y menor ahuecado de frutos en variedades triploides, mejores resultados se obtienen con CPPU (forclorfenuron) a 25-100 ppm aplicados directamente a la flor en cuanto a porcentaje de cuajado y crecimiento partenocárpico del fruto en el cultivar Reina, injertada sobre Shintoza. En variedades diploides (Dulce Maravilla injertada sobre Shintoza), la misma concentración de CPPU produce frutos sin semillas (Miguel y Maroto, 2000), y una baja concentración de 2,4-D, produce el mismo efecto (Maroto, 2000). El principal inconveniente que presenta la utilización de hormonas para el cuajado de frutos de sandía es que puede dar lugar a deformación y ahuecado de frutos (Miguel y Maroto, 2000).

El empleo de colmenas de abejas para la polinización salva el inconveniente de las hormonas, aunque presenta otros, sobre todo en el caso de las variedades triploides, las cuales carecen de suficiente polen fértil para polinizarse y obliga a disponer de una línea de plantas diploides por cada dos de triploides, por tanto el agricultor siempre tendrá un tercio de producción de frutos con semilla, de menor valor económico, además de los inconvenientes de diversa índole que se originan en el manejo del cultivo y de la colmena (Miguel y Maroto, 2000; Camacho *et al.*, 1998).

La recolección suele tener lugar entre los 81 y 99 días después del trasplante. Los rendimientos son bastante variables en función del gran número de parámetros que intervienen, aunque generalmente se sitúan entre los 6-10 Kg x m⁻². La maduración de los frutos es un fenómeno complejo en el que se producen los siguientes cambios: Reblandecimiento, Endulzamiento, Aromatización y Coloración. El corte de fruto de sandía lo realizan especialistas en esta labor observando un conjunto de síntomas externos tales como el color del fruto, si el zarcillo que soporta el fruto está seco, el color de la cama, e incluso rompiendo varios frutos (Camacho, 2003).

Con la implantación del europalet de dimensiones 120 x 80 cm, se utilizan cajas de 40x60 cm con alturas de 18-20 y 22 cm para el envasado de la sandía. Se suelen apilar entre 9 y 10 unidades en altura de este envase que pesa unos 20 Kg, de tal manera que los palets que se manejan pesan entre 720 y 800 Kg (Camacho, 2003).



Foto 1: Detalle de fruto de sandía en crecimiento y flores masculinas

2.1.3. Cultivo sin suelo de sandía.

El cultivo de sandía en hidropónico (sin suelo), ha aumentado desde las primeras experiencias realizadas en los años 90. Este tipo de cultivo destaca sobre todo en plantaciones tempranas donde la precocidad del cultivo es una necesidad (Requena, 1999).

En el sudeste español, se estiman que en 2004 existían entre 4.500 y 5.000 hectáreas en explotación mediante sistemas de cultivo sin suelo (Urrestarazu, 2004).

Aunque los sistemas de cultivo sin suelo son más caros y complicados de manejar, se han ido introduciendo como alternativa a los sistemas tradicionales de cultivo en suelo enarenado debido a la mejora de la productividad. Las plantas encuentran mejores condiciones para el desarrollo de sus funciones ya que la rizosfera se sitúa en las condiciones óptimas de los elementos necesarios (Cánovas, 1994).

Entre las ventajas más importantes de los cultivos sin suelo destacan: la mayor velocidad de crecimiento del cultivo, el sustrato proporciona mejores condiciones de enraizamiento, los nutrientes que se aportan se aplican en solución controlando mejor la fertilidad y el pH del medio enraizante, y teóricamente eliminan los patógenos transmitidos a través del suelo. Aunque todas estas ventajas no son tales sin un conocimiento completo de la tecnología empleada (Zinnen, 1988).

Es muy importante realizar un adecuado manejo del riego en estos sistemas, para ello el sistema más empleado es el de riego a la demanda consistente en colocar dos unidades de sustrato en contacto directo con el fondo de una bandeja en la que se han colocado dos sensores, de manera que cuando el nivel de agua de drenaje baja por debajo de uno de ellos, se manda una señal que dispara automáticamente el riego hasta que el nivel de agua de drenaje alcanza el otro sensor, entonces se detiene el riego (Requena, 1999).

En el cultivo de sandía, desde el trasplante hasta la floración y cuajado, la demanda de agua es muy pequeña, por lo que se darán riegos muy espaciados, y una vez enraizada la planta se mantendrá el sustrato con una humedad comprendida entre el 50 y el 60%. Durante el período de cuajado de frutos, se hará descender el nivel de riego para provocar un incremento de la conductividad eléctrica (CE), que junto con un aumento de la ventilación creará unas óptimas condiciones para la fecundación de los frutos. En el período de engorde de los frutos, se incrementará el número de riegos llegando a drenajes del 30% o superiores en caso de aguas de no muy buena calidad, para después bajarlo una vez alcanzado el tamaño de fruto deseado y evitar así el estallado de frutos (Requena, 1999).

El mayor o menor drenaje va a estar en función de la calidad del agua de riego, siendo mayor cuanto mayor sea la salinidad de la solución aportada. El correcto control de riego debe evitar oscilaciones de pH y en especial de la conductividad en el agua de drenaje con el fin de prevenir el agrietado y ahuecado de frutos producido por bajadas bruscas de la conductividad eléctrica en la fase de crecimiento de los mismos. En la zona del poniente almeriense, con un agua de conductividad en torno al 0,8%, se mantiene un drenaje en torno al 20-25% excepto en engorde que se sube hasta el 30-35% (Camacho, 2003).



Foto 2: Cultivo de sandía sobre sacos de perlita

2.1.4. Enfermedades de la sandía causadas por hongos de suelo

2.1.4.1. Damping-off.

El síndrome de damping off que incluye la caída de plántulas, así como la podredumbre de semillas, fallos de nascencia y podredumbre radicular de plántulas de sandía, ha sido atribuida a varias especies de *Pythium*, incluyendo *P. ultimum*, *P. aphanidermatum*, *P. irregulare*, *P. myriotylum* y a *Phytophthora drechsleri* (Gubler, 1996).

Las podredumbres radiculares causadas por estos patógenos suelen presentar síntomas similares. En plántulas, una podredumbre húmeda se desarrolla en la raíz principal y en el hipocotilo. La caída de plántulas o una marchitez más lenta suelen ir precedidos de clorosis en las hojas y los cotiledones. Las raíces pueden presentar una o varias lesiones (Gubler, 1996).

En Almería, *Pythium aphanidermatum*, especie típica de climas tropicales es capaz de causar graves pérdidas de plántulas con síntomas de marchitamiento en verde debido a una podredumbre húmeda del cuello. Las plantas afectadas se doblan sobre la parte dañada y caen sobre el sustrato (Gómez, 1994).

Al menos dos especies de *Phytophthora*, capaces de causar importantes enfermedades en los cultivos de tomate tipo cereza y pepino holandés de la Vega de Motril-Carchuna, causaron enfermedad al ser inoculadas sobre plántulas de sandía (Álvarez y Gómez, comunicación personal).

Rhizoctonia solani es otro agente que se puede encontrar asociado a la caída de plántulas en semilleros de sandía y otras cucurbitáceas, produciendo una sintomatología prácticamente idéntica a la provocada por *Pythium aphanidermatum* (Gómez, 1994). *Phytophthora* sp, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* y *Chalara elegans* han sido confirmados como agentes patógenos implicados en la caída de plántulas en semilleros del sudeste andaluz. El

complejo MNSV - *O. bornovanus* puede ocasionar un síndrome muy parecido cuando la siembra de melón se realiza sobre un sustrato muy contaminado por el hongo vector del virus (Gómez, 2004).

El control de estas enfermedades es fundamentalmente de tipo preventivo, para ello es fundamental disponer de semillas sanas y realizar el semillero con las máximas garantías sanitarias de los sustratos, agua de riego y bandejas de semillero. La lejía en soluciones variables del 0,3 al 0,5% de cloro y el formol a concentraciones del 3 al 5% pueden utilizarse para la desinfección de material diverso tal como recipientes de cultivo, de solución nutritiva, herramientas, etc. realizando un posterior lavado con agua limpia. La desinfección de los sustratos se puede realizar mediante vapor o fumigantes como el metan-sodio y el formol. En el caso del agua empleada para el riego, se puede recurrir al tratamiento con productos fungicidas o mojantes que no causen fitotoxicidad y que sean efectivos contra los patógenos a tratar. Otros métodos posibles son la desinfección del agua con luz ultravioleta, microfiltración, ozonización o esterilización por calor (Gómez, 1994).

En experimentos realizados con aguas del río Guadalfeo en la Estación Experimental de “La Nacla” en Granada, para el control de especies de *Phytophthora* patógenas sobre tomate y pepino, fue efectiva la cloración del agua de riego con 5 ppm de hipoclorito sódico manteniendo al menos 24 h en contacto el hipoclorito sódico con el agua de riego, antes de ser aplicada a las plantas. La mortandad de las parcelas de tomate tratadas se redujo hasta el 1% frente al 25% de mortandad de las parcelas testigo (Escobar *et al*, 2003).

2.1.4.2. Podredumbre de las raíces y de la base del tallo causada por *Pythium aphanidermatum*.

Los miembros del género *Pythium* son organismos habituales en suelos y aguas de todo el mundo, y ocasionan serios problemas en todos los cultivos de gran importancia agrícola. Aunque *Pythium aphanidermatum*, ha sido tradicionalmente catalogado como agente causal de enfermedades relacionadas con las marras de nascencia de semilleros y muerte de plántulas en una amplia variedad de cultivos, también ha sido demostrada su capacidad parasitaria en plantas adultas de pepino (Tello *et al*, 1990), judía (Serrano *et al*, 2008) y sandía (Guirado *et al.*, 2009a).

La patogenia del hongo sobre plantas adultas de sandía cv Sugar Baby fue demostrada tras la realización de varios experimentos en el IFAPA de Almería. *Pythium aphanidermatum* inoculado sobre plantas adultas de sandía, en estado fenológico de entre 8 y 12 hojas verdaderas, sin injertar y cultivadas en sustrato de perlita, causó la necrosis generalizada del sistema radicular y en ocasiones, necrosis de la base del tallo, que en uno de los experimentos, llegó a afectar hasta el 68% de las plantas inoculadas. En el mismo experimento, el síntoma de marchitez y muerte de las plantas fue del 45%.

Las mermas de cosecha provocadas por el patógeno, fueron importantes aunque variables, siendo más elevadas (del 39%), cuando el patógeno produjo síntomas más precoces, y no cuando fue capaz de ocasionar una mayor mortandad.

Los síntomas más generalizados y severos dependieron de las condiciones ambientales asociadas al estado vegetativo de las plantas que se dieron en los distintos años en que se realizaron los experimentos, aunque todos fueron realizados en campaña de primavera, pero en distintos años (Guirado *et al*, 2009a).

2.1.4.3. La fusariosis vascular de la sandía.

La fusariosis vascular de la sandía ha sido una enfermedad limitante de gran importancia de este cultivo en todo el mundo. La enfermedad está causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* Snyder y Hansen (Smith, 1992), y fue descrita por primera vez en Georgia y Carolina del Sur (Estados Unidos). Actualmente, el patógeno se encuentra distribuido por todo el mundo incluyendo Australia, Sudamérica, Asia y Norte de África. La enfermedad puede ser muy destructiva y un factor limitante en las zonas de cultivo de sandía (Martyn, 1996).

En España, la fusariosis vascular de la sandía fue citada por primera vez en la provincia de Valencia (Tello y García, 1977), y posteriormente en Almería y Sevilla (Cuadrado y Gómez, 1983).

Los síntomas de fusariosis dependen de los factores ambientales, del estado fenológico de las plantas en el momento de la infección y de la agresividad y densidad de las poblaciones del patógeno. Cuando la población del patógeno es muy alta produce síntomas de damping-off en plántulas, en cultivos estériles también puede producir podredumbre de las semillas. En plantas adultas, los síntomas comienzan con una apariencia verde-grisácea de las hojas seguida de amarilleo que generalmente comienza por las hojas más viejas y avanza hacia las más jóvenes. La marchitez se da rápidamente cuando las plantas se encuentran en condiciones de estrés o cargadas de frutos (Martyn, 1996).

La marchitez se puede manifestar de forma unilateral o únicamente en algunos tallos de la planta, sobre los que se aprecia un flujo pegajoso y una acumulación de goma en el interior (Messiaen *et al.*, 1995).

El síntoma de marchitez es resultado de una ineficiencia en el transporte de agua causada por la formación de tilosas, gomas y geles y rotura de las células parenquimáticas del xilema. Una vez que aparece la marchitez,

las hojas se desecan y necrosan y las plantas pueden morir en 2 ó 3 días. Las plantas que no se marchitan y mueren quedan enanas con un desarrollo muy pobre (Martyn, 1996).

Cuando se realiza un corte transversal de los tallos se puede observar una coloración amarillenta o marrón de uno o varios de los haces vasculares de la planta. Se conocen tres razas fisiológicas del patógeno dentro de la forma especializada: 0, 1 y 2. En Almería se encuentran presentes las razas 0 y 2 del patógeno (Gómez, 1994).

Los propágulos del hongo pueden ser diseminados por el suelo, restos de plantas enfermas y operaciones de cultivo tales como podas y recolección de frutos, y por las semillas de plantas infestadas (Bruton, 1998).

La conservación del hongo mediante clamidosporas en el suelo, hace inviable el control de la enfermedad mediante técnicas tradicionales tales como la rotación de cultivos, o mediante desinfección o solarización del suelo, aunque se consigue disminuir su gravedad. El control más eficaz del patógeno se consigue mediante el uso de variedades resistentes o mediante el injerto de la variedad sobre patrones de híbridos interespecíficos de *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata* y *Lagenaria siceraria* (Miguel y Maroto, 1996).

2.1.4.4. Necrosis radicular causada por *Olpidium bornovanus*.

Tanto en los cultivos en suelo como en los “sin suelo” de la provincia de Almería es muy frecuente la presencia de dos hongos de suelo, parásitos obligados, pertenecientes al género *Olpidium*: *O. bornovanus* y *O. brassicae*, que parasitan las raíces de plantas de melón, pepino y sandía (Gómez, 1988 y 1989). *O. brassicae*, además, parasita las raíces de otros cultivos no pertenecientes a la familia de cucurbitáceas, tales como tomate, pimiento berenjena y judía (Gómez, 1990).

Ambas especies son vectores de virus que causan enfermedades importantes en varias especies de cucurbitáceas: *O. brassicae* transmite el *Virus de la necrosis del tabaco* (TNV), y *O. bornovanus* transmite el *Virus de la necrosis del pepino* (CNV), el *Virus de las manchas foliares del pepino* (CLSV) y el *Virus de las manchas necróticas del melón* (MNSV) (Campbell *et al.*, 1995).

O. bornovanus, fue detectado también en los embalses utilizados para el riego de los cultivos bajo plástico en la comarca del Campo de Dalías (Almería) durante los años 1989 y 1990, los experimentos realizados demostraron la transmisión del hongo, a través del agua de riego, y la posibilidad de que el virus fuese introducido a través del hongo vector, ya que en los invernaderos regados con aguas procedentes de embalses no contaminados, no se observaron síntomas de la enfermedad causada por MNSV (Gómez y Velasco, 1991).

La presencia de *O. bornovanus* asociado de manera consistente a necrosis del sistema radicular de melón, sandía y pepino, podría deberse a la exteriorización de un síntoma causado sólo por este hongo o asociado a otros hongos de suelo. En experimentos de inoculación realizados en melón cv. Vital resistente a MNSV, sobre cultivo hidropónico de lana de roca, se puso de manifiesto la patogeneicidad de *O. bornovanus* ya que existieron mermas de producción significativas con respecto al testigo y un menor tamaño de los frutos, quizás causados por las necrosis del sistema radicular de las plantas inoculadas (Gómez, 1993).

Guirado *et al* (2009b) también encuentran una relación directa entre la necrosis del sistema radicular de las plantas y la presencia de tanto esporangios como esporas de resistencia en las raíces de plantas inoculadas de melón, pepino y sandía.

La sospecha de que *O. bornovanus* pudiera estar implicado en el colapso de cultivos de melón tipo cantalupo en California y Arizona

(Stanghellini *et al*, 2009), llevó a estudios posteriores que confirmaron la patogeneicidad del hongo causando necrosis radicular y una importante reducción del peso fresco de las plantas inoculadas de hasta el 40% con respecto a las no inoculadas, cuando se inocularon plantas de melón con un aislado monoesporangial de *O. bornovanus* libre de MNSV (Stanghellini *et al.*, 2010).

Según Campbell y Sim (1994), aislados específicos de *O. bornovanus* libres de virus fueron capaces de causar necrosis y de reducir el desarrollo del sistema radicular en plantas de melón y pepino al compararlas con las no inoculadas o con las inoculadas con cepas de *O. brassicae*.

2.1.5. El colapso o muerte súbita de la sandía

2.1.5.1. El “colapso de la sandía” causado por *Monosporascus cannonballus*.

El género *Monosporascus* fue creado por Pollack and Uecker en 1974, cuando procedieron a clasificar un hongo asociado a raíces de melón tipo cantalupo procedente de Arizona y considerado agente causal de la podredumbre de raíces secundarias bajo condiciones de invernadero (Troutman and Matejka, 1970), dicho hongo fue nombrado por los autores como *M. cannonballus*.

Posteriormente otra especie perteneciente a este género, *Monosporascus eutypoides* fue encontrada en Israel asociada a raíces de melón de plantas colapsadas (Reuveni and Krikun, 1983). En trabajos posteriores, también realizados en Israel, se demuestra la capacidad de *M. eutypoides* para causar el colapso de casi el 50% de las plantas de melón cv. Galia inoculadas con el hongo bajo condiciones controladas. Los síntomas aparecieron antes y su evolución fue más rápida en plantas mantenidas en un régimen de temperaturas de 30/20°C, que en las plantas que se mantuvieron entre 25/20°C (Reuveni *et al*, 1983).

En 1991, Sivanesan concluye que *M. cannonballus* y *M. eutypoides* son casi idénticos en todos los caracteres morfológicos excepto en el número de ascosporas por asca y en su capacidad germinativa, con lo cual pueden ser considerados coespecíficos. Por todo ello, Bruton (1998), considera sinónimos a las dos especies asignándole al hongo el nombre de *M. cannonballus*, aunque considera necesarios estudios más profundos que confirmen este hecho.

Los síntomas que presentan las plantas cultivadas en las que el hongo es detectado en las raíces son enanismo, amarilleo y necrosis de las hojas del ápice seguida de una necrosis progresiva de las hojas. Aproximadamente de 10 a 14 días antes de la recolección la cubierta vegetal puede colapsar exponiendo los frutos a la intensa radiación solar (Martyn and Miller, 1996). El colapso de las plantas suele ocurrir una semana antes de la recolección (Mertely *et al.*, 1991).

Los síntomas primarios sobre las raíces incluyen un pardeamiento extensivo y necrosis de la raíz principal y raíces laterales, decoloración vascular y discreto pardeamiento de las lesiones corticales. El colapso y podredumbre radicular causados por *M. cannonballus* puede ser distinguido de otro tipo de colapso en melón por la presencia de peritecas negras en las raíces y la ausencia de decoloración vascular o lesiones en las partes aéreas de las plantas (Mertely *et al.*, 1991).

Todas las cucurbitáceas parecen susceptibles al ataque de *Monosporascus*, aunque su grado de susceptibilidad varía entre y dentro de las diferentes especies (García Jiménez *et al.*, 1994).

El patógeno se encuentra distribuido por las zonas cálidas del planeta en las que se realizan cultivos de melón y sandía. Así ha sido descrito asociado a plantas de melón y/o sandía con síndrome de colapso en Estados Unidos (Arizona, California y Texas), España, Israel, Túnez, Taiwán y Japón (Martyn *et al.*, 1994 y 1995). También ha sido descrito asociado al mismo síndrome en

México (Martyn *et al.*, 1996), Arabia Saudí (Karlatti *et al.*, 1997), Honduras (Bruton and Miller, 1997a), Guatemala (Bruton and Miller, 1997b) y Brasil (Sales *et al.*, 2004).

Al parecer, las altas temperaturas diurnas y temperaturas nocturnas en torno a los 25°C pueden causar un incremento del colapso causado por *M. cannonballus* (Bruton, 1998; Kim *et al.*, 1995). La severidad del colapso está también asociada a la carga de frutos de la plantas (Pivonia *et al.*, 1997; Wolf, 1996; Wolf *et al.*, 1997).

En España fue descrito por primera vez asociado a raíces de melón y sandía con síndrome de colapso en zonas de Valencia, Murcia y Almería, aunque no fue probada su patogeneicidad mediante inoculación con aislados purificados de forma experimental (Lobo, 1990b).

Aunque en inoculaciones artificiales con el hongo diversos autores han probado su patogeneicidad reproduciendo síntomas de necrosis radicular, enanismo y reducción del peso seco del sistema radicular y de la parte aérea de las plantas (Mertely *et al.*, 1991; Martyn *et al.*, 1996; Gwynne *et al.*, 1997; Karlatti *et al.*, 1997 y Sales *et al.*, 2004), el síndrome de colapso o muerte súbita, sólo ha sido reproducido en plantas de melón cv. Galia inoculadas con *M. eutypoides* por Reuveni *et al.*, en 1983, por Pivonia *et al.*, en 1997 sobre plantas de melón y fueron Mertely *et al.*, en 1993 los que reprodujeron el colapso generalizado en inoculaciones artificiales con *M. cannonballus* tanto en sandía (cvs. Black Diamond y Royal Sweet) como en melón (cvs. Magnum 45 y Hale`s Best Jumbo), tras 67 días después de la inoculación. Los mismos autores, reproducen además los síntomas de necrosis radicular y reducción del peso seco de la raíz y de la parte aérea, con una importante severidad en los dos cultivares de sandía probados, que se muestran más susceptibles que los de melón.

Sin embargo, en experimentos realizados en el IFAPA de Almería por Gómez en otoño de 1991, inoculando dos aislados de *M. cannonballus*,

obtenidos de plantas de melón con síntomas de podredumbre radicular en cultivos en suelo de Almería, sobre plantas de melón cv. Gallicum, no hubo diferencias significativas con respecto al testigo sin inocular ni en el porcentaje de plantas muertas ni tampoco con respecto a la producción final de frutos totales y comerciales, de manera que no pudo establecerse la asociación entre el patógeno y el síndrome de “muerte súbita” (Gómez, 1993).

En otros experimentos, realizados también en el IFAPA de Almería, se obtuvieron resultados similares al realizar inoculaciones con el hongo sobre plantas de sandía cv Sugar Baby en cultivo sin suelo, de manera que tampoco se pudo vincular a *M. cannonballus* con el síndrome de “muerte súbita” en sandía (Guirado *et al*, 2009a).

En cuanto al control de la enfermedad, parece ser que el riego por goteo reduce la incidencia de la enfermedad, para lo cual se han dado dos explicaciones: una basada en que el aporte continuo de agua reduciría la temperatura del suelo limitando así el crecimiento de este hongo termofílico y otra que aduce que dicho aporte continuo hace que la raíz, aunque deteriorada, tiene más fácilmente disponible el agua y así se retrasaría la muerte de la planta (García Jiménez *et al*, 1994).

Una práctica lógica que resulta conveniente es la rotación de cultivos, alternando cultivos susceptibles con otros que no lo sean (García Jiménez *et al*, 1994).

La solarización del suelo no parece ser adecuada para el control de esta enfermedad debido a la naturaleza termofílica del hongo que podría producir los efectos contrarios a los esperados por la eliminación de organismos competitivos e incluso la selección de cepas de *Monosporascus* altamente termofílicas (García Jiménez *et al*, 1994).

Parece ser que la fumigación del suelo con diferentes productos químicos como el dicloropropeno, solo o mezclado con cloropicrina, da buenos

resultados, mientras que los tratamientos con metam-sodio han dado resultados contradictorios (García Jiménez *et al.*, 1994). Dentro de los fungicidas que se han mostrado eficaces en la inhibición del crecimiento de *Monosporascus* tanto en pruebas in vitro como en experimentos de campo ha sido el fluazinam (Cohen *et al.*, 1999).

2.1.5.2. Acremoniosis: el colapso de la sandía causado por *Acremonium cucurbitacearum*.

La primera cita del colapso del melón causado por *Acremonium* sp., en zonas de cultivo de la Comunidad Valenciana, Murcia y Almería aparece en España en 1989 (García-Jiménez *et al.*, 1989b). Posteriormente el patógeno fue identificado como *Acremonium cucurbitacearum* A. Alfaro-García, W. Gams *et J.* García-Jiménez (Alfaro-García *et al.*, 1996). Aunque el hongo es aislado consistentemente de las parcelas afectadas por colapso, no es aislado igualmente de todas las plantas con síntomas de colapso. Los autores achacan al hongo la causalidad de la enfermedad, reproduciendo síntomas observados en plantas colapsadas en campo tales como podredumbre de raíz, decoloración y necrosis de raicillas y acorchamiento del cuello, pero sin reproducir el colapso de las plantas (García-Jiménez *et al.*, 1993)

En inoculaciones artificiales con *Acremonium*, los síntomas típicos de la enfermedad aparecen muy pronto y consisten en lesiones pardo-amarillentas en la unión del tallo con la raíz, necrosis de raíces secundarias y terciarias y posteriormente el acorchamiento del hipocotilo. Todo el proceso va acompañado de una continua emisión de raíces adventicias en la zona del hipocotilo. Finalmente se produce el colapso y muerte de las plantas (García-Jiménez *et al.*, 1994).

El hongo se puede aislar de la zona de la unión del tallo y la raíz sólo a los cuatro días de la plantación en un suelo infestado de forma natural

(Armengol *et al.*, 1996). El colapso de la parte aérea de la planta suele ocurrir entre 1 y 2 semanas antes de la recolección de los frutos, sin lesiones en el hipocotilo. Las estructuras de conservación del hongo en el suelo parecen ser las clamidosporas aunque no ha sido probada su capacidad para infectar a las raíces de melón o sandía (Armengol *et al.*, 1998).

La enfermedad, tanto en melón tipo cantalupo, como sobre diferentes especies del género *Cucumis*, *Cucurbita* (tipo calabacín) y *Citrullus* causada por aislados de *Acremonium* sp., procedentes de Texas (EEUU), es muy similar a la producida por los aislados españoles del patógeno (Bruton *et al.*, 1996). Sin embargo, cuando se realiza una valoración de la virulencia de los distintos aislados teniendo en cuenta parámetros tales como daños en el hipocotilo, en la unión del tallo y la raíz, en la raíz principal, en las raíces secundarias y reducción de área foliar, los aislados españoles del hongo inoculados sobre melón se comportan como muy virulentos, mientras que los aislados norteamericanos se comportan como poco o moderadamente virulentos (Bruton *et al.*, 2000a).

En experimentos realizados en Almería inoculando un aislado de *Acremonium* sp. proporcionado por el Dr. García-Jiménez sobre plantas de melón cv. Gallicum y sustrato de lana de roca y realizados en otoño de 1991 y primavera de 1992, éste no produjo síntomas de necrosis radicular ni porcentaje de plantas muertas significativamente diferentes del testigo sin inocular, por tanto, en las condiciones ensayadas, no se pudo asociar el síndrome de “muerte súbita” a *Acremonium* sp. (Gómez, 1993).

En 1990, García Jiménez y colaboradores, en trabajos realizados en la Comunidad Valenciana citan a *Acremonium* sp. como agente causal de una decoloración y acorchamiento del hipocotilo en plántulas de sandía, sin embargo no aclaran si los síntomas se dan en plántulas cultivadas o inoculadas artificialmente, en todo caso no lo citan como agente causal del colapso en sandía.

En los valles de Sacramento y San Joaquín (EEUU), *Acremonium* sp. ha sido asociado a cultivos de melón tipos cantalupo y honey dew, calabacín y sandía, con síntomas de colapso. Las plantas mostraban lesiones marrones en la unión de raíces secundarias y acorchamiento y deformación de raíces (Bruton *et al.*, 1995).

En inoculaciones artificiales con aislados de *Acremonium cucurbitacearum* obtenidos de raíces de plantas de melón con síntomas de colapso en la Comunidad Valenciana, la sandía se muestra como susceptible al patógeno mostrando síntomas de moderada decoloración y pocas lesiones en la raíz principal, mientras que en las raíces secundarias y en el hipocotilo los síntomas son decoloración severa y abundantes lesiones (Armengol, *et al* 1998).

Estos síntomas son muy parecidos a los observados en melón inoculados con los mismos aislados, sin embargo, en las zonas cultivadas no parece haber problemas de colapso en sandía asociado a *Acremonium*, hecho que los autores atribuyen a que casi todas las sandías cultivadas se encuentran injertadas sobre patrones híbridos de *Cucurbita maxima* x *Cucurbita moschata* tales como Brava, Shintoza y RS-841, para controlar la fusariosis vascular y que son también resistentes a *Acremonium cucurbitacearum* (Armengol, *et al* 1998).

Resultados similares se obtuvieron al inocular un aislado de *Acremonium cucurbitacearum* obtenido de plantas de melón en Texas, mostrándose las variedades de sandía Jubilee y Crimson sweet, más susceptibles que las variedades de melón tipo cantalupo inoculadas. Las plantas de sandía inoculadas mostraron síntomas de moderada a severa podredumbre del hipocotilo, de la raíz principal y secundarias y un menor peso seco tanto de la parte aérea como del sistema radicular (Bruton *et al.*, 2000b).

Un adecuado control de la acremoniosis debe complementar la actuación en diversos frentes complementarios ente sí, como los que se citan a continuación:

Medidas culturales.- la muerte de la planta se produce por un desequilibrio entre la absorción de agua por la raíz deteriorada y las necesidades hídricas de la parte aérea. Todas las medidas que contribuyan a que este desequilibrio sea menor harán que descienda la mortalidad de las plantas. Las plantas no deben sufrir estrés hídrico sobre todo cuando se dan días de altas temperaturas o vientos cálidos. No se debe forzar el abonado nitrogenado ni abusar del estiércol (Gubler, 2004)

Control químico.- un suelo puede ser desinfestado mediante fumigantes o solarización sola o con la adición de fumigantes a bajas dosis. En lo que respecta a tratamientos durante el cultivo, se deben tener en cuenta tres factores: fungicida a aplicar, momento de aplicación y forma de aplicación (Gubler, 2004)

Utilización de portainjertos.- en la actualidad esta técnica es la que mejor resultado está dando para controlar esta enfermedad, sobretodo en riego a manta, aunque tiene el inconveniente de su alto coste. Este es un método de lucha contra enfermedades del suelo que mediante el uso de un portainjerto o patrón (raíz) resistente al patógeno evita el contacto entre la planta sensible y el suelo infestado con el patógeno (García Jiménez *et al*, 1994). En el caso del melón, aunque el injerto no asegura la supervivencia de todas las plantas, sí parece estar constatado el retraso en la mortalidad de las plantas injertadas, que sobreviven alrededor de un mes más que las plantas sin injertar, lo cual permite acabar con éxito el ciclo de cultivo (Miguel *et al*, 1993)

Plantación poco profunda.- En caso de que se practique una plantación poco profunda, se obtienen mejores controles y resultados al aplicar fungicidas

pulverizados directamente sobre las semillas en el momento de la siembra (Gubler, 2004).

2.1.5.3. El colapso causado por el *Virus de las Manchas Necróticas del Melón (MNSV)*.

En Almería la muerte súbita del melón y la sandía empezó a observarse a primeros de los años 80. Los síntomas más característicos de la enfermedad eran la necrosis del hipocotilo y la necrosis de las raíces de las plantas afectadas junto con la muerte masiva de las plantas. Más tarde surgió la hipótesis de que dicho síndrome estuviese causado por el MNSV, con síntomas consistentes en un marchitamiento en verde de las plantas y un chancro de color marrón claro en la zona del hipocotilo. La mayoría de las veces el tallo aparece totalmente deshidratado al efectuar un corte transversal sobre él, o con tintes marrones. El sistema radicular de las plantas es escaso y unas veces aparece de color marrón y otras con aspecto totalmente sano (Gómez *et al.*, 1988; Cuadrado *et al.*, 1993).

En trabajos experimentales realizados inoculando el MNSV de forma mecánica sobre plantas de melón cultivadas en macetas durante tres meses en dos sustratos diferentes: vermiculita y mezcla de turbas, se confirmó la patogeneicidad del virus que causó la mortandad del 45 y el 55% de las plantas adultas para los sustratos de vermiculita y mezcla. La sintomatología que presentaron las plantas consistió fundamentalmente en necrosis del hipocotilo en el 80 y 85%, estrías necróticas en el 45 y 85%, cribado en hojas en el 45 y 75% y enrejado en el 0 y 45% para los sustratos de vermiculita y mezcla de turbas respectivamente. El MNSV fue detectado en el 100% de las plantas inoculadas (Cuadrado *et al.*, 1993).

En el caso de plantas adultas de melón en cultivo hidropónico, inoculadas de forma mecánica y mediante un aislado de *O. bornovanus* portador de MNSV, fueron patentes las diferencias, cuando el virus se inoculó

mecánicamente los síntomas más evidentes fueron lesiones locales, cribado de las hojas, enrejado, estrías en el tallo y muerte de las plantas, con porcentajes del 100, 86.7, 63.3, 90 y 86.7% respectivamente, y no causó síntomas de necrosis del hipocotilo, mientras que cuando el virus fue transmitido a través de un aislado de *O. bornovanus* portador de MNSV, los síntomas más destacables fueron la necrosis del hipocotilo del 93.3% de las plantas y muerte del 76.7% de las mismas, e incluso una de ellas murió sin mostrar síntoma alguno, aunque también aparecieron estrías sobre los tallos pero en menor porcentaje (Cuadrado *et al.*, 1993).

De todas formas, se puso en evidencia la capacidad parasitaria de MNSV en melón para causar la muerte repentina de las plantas, justo antes o cuando éstas entran en producción, tanto cuando éste es inoculado mecánicamente, como cuando lo es a través del hongo vector (Gómez, 1993).

En un experimento realizado en sandía cv Sugar Baby en cultivo hidropónico sobre perlita, la inoculación de un aislado de *O. bornovanus* portador de MNSV causó la muerte del 76% de las plantas con síntomas de necrosis del hipocotilo, del sistema radicular, de los tallos y de las nerviaciones de las hojas, mientras que el síntoma de cribado de las hojas sólo se observó de forma puntual. Estos síntomas, junto con la muerte de las plantas en el período de engorde de los frutos reprodujeron con bastante similitud el síndrome de la “muerte súbita de la sandía”. Las mermas en la producción comercial alcanzaron el 88% con respecto a las plantas testigo (Guirado *et al.*, 2009a).

En otros dos experimentos realizados en años distintos e inoculando el mismo aislado de *O. bornovanus*, en sandía, el número de plantas muertas no fue significativamente diferente del control no inoculado, el síntoma de necrosis de hipocotilo varió en estos dos experimentos entre el 6,5 y el 56%. Las mermas de producción comercial fueron del 28 y 31% respectivamente en ambos experimentos (Guirado *et al.*, 2009a).

Estos resultados indican el poder patógeno de *O. bornovanus* cuando es portador de MNSV bajo condiciones ambientales muy determinadas que no parecen repetirse todos los años, y permite relacionarlo con el síndrome de “muerte súbita”. La infección causada por *O. bornovanus* conjuntamente con MNSV, muestra tener un poder patógeno significativamente mayor que cuando se inocula sólo el virus de forma mecánica (Guirado *et al.*, 2009a).

Además, se ha evidenciado la capacidad del hongo vector para causar la necrosis del sistema radicular y mermas de producción por sí solo (Gómez, 1993; Stanghellini *et al.*, 2010).

Todos estos experimentos pueden explicar la situación que se dio en los invernaderos de Almería durante los años ochenta y noventa cuando la mayoría de las plantas de melón y sandía se marchitaban y morían mostrando sólo necrosis del hipocotilo e incluso un pequeño porcentaje morían sin mostrar síntoma alguno (Cuadrado *et al.*, 1993).

En otros trabajos fue detectada la presencia del hongo vector, *O. bornovanus*, en un alto porcentaje de los suelos cultivados en la zona del Campo de Dalías, así como en los sustratos de mezclas de turbas utilizados para el cultivo de plántulas y en las raíces de plántulas para el trasplante producidas por los propios agricultores o en semilleros comerciales. Este hecho junto con la transmisión del virus por la semilla y la detección del hongo vector en las aguas utilizadas para el riego de los cultivos, podrían explicar la rápida y amplia expansión que tuvo la enfermedad en esta zona de cultivo durante la década de los 80 (Gómez, 1989; Gómez y Velasco, 1991), tanto en cultivos tradicionales como en cultivos sin suelo sobre sustratos inertes (Gómez, 1990).



Foto 3: Necrosis de hipocotilo causada por MNSV en planta de melón

El colapso del melón y la sandía causados por MNSV, ha sido también descrito en Israel. En el caso del melón fue observado el colapso de cultivos en invernadero que en ocasiones llegaron a afectar a la totalidad del cultivo. Las plantas presentaron síntomas de manchas cloróticas sobre las hojas que evolucionaron a necróticas, posteriormente el virus infectó a las plantas de forma sistémica, causando por último la muerte de las mismas. En la sandía el colapso fue observado tanto en cultivos en invernadero como al aire libre. La infección causó severas necrosis en las hojas, tallos y frutos ocasionando importantes pérdidas económicas (Antignus *et al.*, 1997).

2.1.5.4. Colapso de la sandía de etiología desconocida.

Desde mediados de los años ochenta y de manera esporádica, en el suroeste de Indiana (EEUU), viene ocurriendo una marchitez de los tallos en los cultivos de sandía cerca de la época de recolección. El síntoma más característico es una marchitez y posterior colapso de las plantas. Las plantas afectadas tienen pocas raíces secundarias y las raíces primarias presentan podredumbre húmeda o seca (Egel *et al.*, 2001).

La marchitez súbita aparece en zonas bajas de los campos cultivados, donde el drenaje no es muy bueno. Los tallos de las plantas se marchitan

rápidamente, las hojas viejas amarillean antes de colapsar y no aparece ningún síntoma aéreo que pudiera ser distintivo de la enfermedad. Las áreas afectadas aumentan con el tiempo y la marchitez súbita puede dispersarse a zonas más altas y bien drenadas del campo. Las raíces de las plantas muy marchitas se encuentran totalmente podridas (2).

Bajo determinadas condiciones la incidencia de la enfermedad se incrementa durante el verano y con frecuencia produce el colapso de grandes zonas cultivadas. Las consistentes observaciones asociadas con la enfermedad son:

- Todos los cultivares de sandía son igualmente susceptibles
- Los cultivos de melón y otras cucurbitáceas no son afectados
- La enfermedad aparece en campos en los cuales ha sido utilizado el acolchado con plástico.
- En experimentos realizados en 2000, los fungicidas de suelo y el control biológico no han sido efectivos en prevenir la expresión de los síntomas.
- El síndrome aparece en campos fumigados.
- No parece que ningún organismo de suelo por sí solo sea el responsable de causar el síndrome (1).

Aunque la podredumbre de la raíz indica que la causa de la enfermedad es infecciosa, se sospecha que existen factores culturales que contribuyen significativamente al desarrollo de la marchitez. La utilización de acolchado plástico y el riego parecen incrementar la incidencia de la marchitez, en campos con estos sistemas de cultivo las pérdidas observadas fueron cercanas al 88%. Las plantas afectadas por marchitez súbita producen poco y los frutos son de pobre calidad (2).

La causa exacta de la marchitez súbita es desconocida. Parece ser que los factores ambientales y culturales predisponen a las raíces a la infección por varios hongos de suelo que actúan solos o conjuntamente. La enfermedad

se dispersa más rápidamente dentro de las hileras de cultivo con lo cual la hipótesis que dan los autores es que debido a la densidad del crecimiento radicular y a los elevados niveles de humedad del suelo bajo el acolchado plástico hacen que el patógeno se disperse por una línea continua de tejido susceptible en condiciones favorables (2).

En la primavera de 2003 el problema apareció por primera vez en el suroeste de Florida (EEUU), y en otoño de ese mismo año en las zonas cultivadas de sandía del oeste y centro del mismo estado. Los síntomas que se observaron fueron un leve amarilleo o área tenue en el campo de cultivo seguido de marchitamiento de los tallos, hojas secas, defoliación y un colapso rápido de los tallos. En la mayoría de los casos la progresión de los síntomas fue muy rápida con una semana a diez días entre la aparición de los primeros síntomas y la destrucción del campo entero. En un alto porcentaje de los campos afectados los frutos recolectados presentaron una necrosis grasienta que rodea el interior de los frutos no comerciales. En la mayoría de los casos la calidad de los frutos se redujo de una manera importante. Se estimó que aproximadamente el 60% de la superficie de sandía en algunas comarcas se vio afectada por la enfermedad que causó entre el 30 y cerca del 100% de pérdidas en algunos campos (3).

Los estudios continuaron durante varios años, ya que la misma sintomatología seguía produciéndose en el momento de la recolección. Finalmente, en 2007, se descubre un nuevo virus nombrado como Squash Vein Yellowing Virus y transmitido por *Bemisia tabaci*, como agente causal del marchitamiento súbito de la sandía y otras cucurbitáceas como melón, pepino, calabacín, etc, en Estados Unidos (Egel and Adkins, 2007).

2.2- El binomio *Olpidium bornovanus*/MNSV.

2.2.1- Características generales del género *Olpidium*.

El género *Olpidium* pertenece a la Familia *Olpidiaceae* que incluye a los *Quitridiales holocárpicos* (sin micelio), inoperculados parásitos de algas, hongos, musgos, granos de polen y tejidos vegetativos de las angiospermas. El talo se transforma en un esporangio único o en un esporangio de resistencia. La reproducción sexual se realiza mediante la fusión de isoplanogametos, que son gametos nadadores morfológicamente semejantes pero fisiológicamente distintos, los cuales se unen en el agua formando un cigoto móvil, que posteriormente infectará una célula del huésped y dará lugar a un esporangio de resistencia (Alexopoulos and Mims, 1985).

La reproducción asexual se produce, al igual que en la mayoría de los hongos flagelados, mediante un esporangio. Durante las primeras fases del desarrollo, el protoplasma que contienen los esporangios se encuentra sin segmentar, con muchos núcleos. A medida que el esporangio se desarrolla, el protoplasma entero experimenta segmentación en numerosas porciones uninucleadas, cada una de las cuales se transforma en una zoospora. Después de emerger del esporangio, éstas nadan durante un cierto tiempo, se enquistan, reabsorbiendo o perdiendo su flagelo en el proceso, y luego germinan teniendo lugar la infección a través de un poro que se perfora por digestión de la pared celular del hospedante. Por él, el protoplasto del parásito entra en la célula huésped dando lugar a un nuevo esporangio (Alexopoulos and Mims, 1985).

Las dos especies más conocidas de este género son *Olpidium bornovanus* y *Olpidium brassicae*.

O. brassicae es considerado el vector de la enfermedad de las Venas Grandes de la Lechuga (*Lettuce big-vein disease*) que ocurre en zonas de cultivo de clima mediterráneo. Esta enfermedad está asociada con un complejo de dos virus: el Virus Asociado de las Venas Grandes de la Lechuga

(*Lettuce big-vein associated virus*) o LBVaV y el virus de Mirafiori de las Venas Grandes de la Lechuga (*Mirafiori lettuce big-vein virus*) o MLBVV (Maccarone *et al.*, 2010).

Por otro lado, *O. brassicae* es morfológicamente muy parecido a otra especie llamada *Olpidium virulentus*, que principalmente se diferencia del anterior en que es más polífago y no infecta a plantas de la familia de las *Brassicaceae*, mientras que *O. brassicae* si que es capaz de hacerlo (Sahtiyanci, 1962). Sin embargo, recientes estudios, han demostrado que es la especie *O. virulentus*, la que es capaz de infectar a lechuga y no a especies de la familia *Brassicaceae*, mientras que ocurre lo contrario con *O. brassicae* (Maccarone *et al.*, 2010).

Todos ellos son parásitos obligados, y se encuentran asociados a raíces de un gran número de especies de plantas tanto cultivadas como silvestres. Tanto su morfología como su ciclo de vida son muy similares, pero *O. brassicae* y *O. virulentus* pueden ser distinguidos de *O. bornovanus* en base a algunas características, siendo las principales:

- La forma del esporangio de resistencia que mientras que en las especies *O. brassicae* y *Olpidium virulentus* es estrellado, en *O. bornovanus* es de pared gruesa y lisa con aspecto interno de panal (Lange & Insuza, 1977), (Koganezawa *et al.*, 2005).
- El tamaño y la forma de las zoosporas, las de *O. bornovanus* son alargadas y con una longitud de 7-8 micras, y las de *O. brassicae* son esféricas de unas 3 micras de diámetro (Lange & Insuza, 1977).
- Las temperaturas óptimas de crecimiento que para *O. bornovanus* se encuentran entre los 25-30 °C, y para *O. brassicae* alrededor de los 20°C (Teakle y Thomas, 1985).

Ambas especies poseen una gran capacidad para conservarse en el suelo, en algunos casos hasta 15 años, en dos experimentos realizados con semillas procedentes de plantas libres de MNSV cultivadas sobre un suelo

secado y conservado durante cuatro y cinco años se confirman tanto la viabilidad de *O. bornovanus* hongo como del virus que portaba (Guirado *et al*, 2009b).

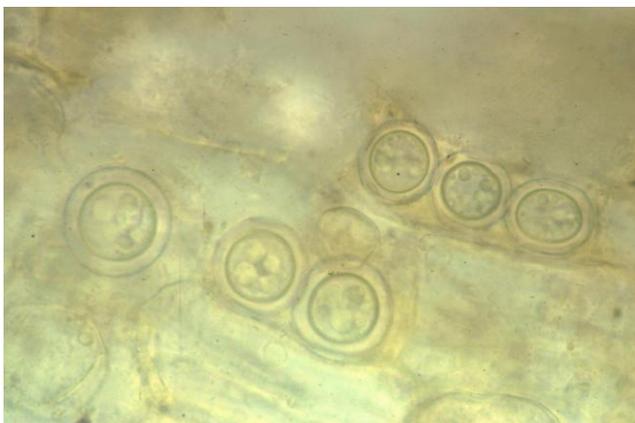


Foto 4: Esporangios de resistencia de *Olpidium bornovanus*

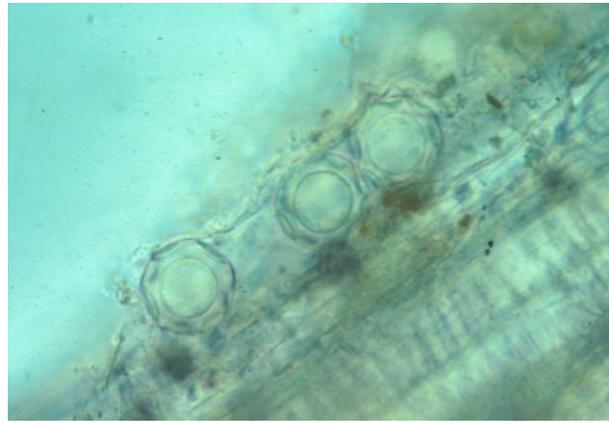


Foto 5: Esporangios de resistencia de *Olpidium brassicae*

2.2.2. La especie *Olpidium bornovanus* (= *O. radicale*, *O. cucurbitacearum*)

La forma de vida y desarrollo de este tipo de hongos se conoce con cierta amplitud gracias a las investigaciones de (1912) sobre el ciclo de vida de *Olpidium viciae*, parásito de la veza (*Vicia unijuga*), en ellas se describen tanto la citología como la reproducción sexual del hongo (Schwartz y Cook, 1928).

La primera descripción completa y exhaustiva del hongo encontrado parasitando las raíces de *Veronica beccabunga* fue realizada por Schwartz y Cook en 1928 con el nombre de *Olpidium radicale*.

En 1968, Barr describe una nueva especie de *Olpidium* que es capaz de parasitar las raíces de distintas especies de cucurbitáceas como pepino, melón, calabacín, calabaza y sandía y no las de una gama de hospedadores pertenecientes a diversas familias botánicas tales como leguminosas, crucíferas, gramíneas, etc., por este motivo nombra a esta especie como

Olpidium cucurbitacearum, asegurando que en este aspecto es diferente del hongo *Pleotrachelus bornovanus*, del que también difiere morfológicamente.

Posteriormente, Lange e Insuza (1977), comparando la especie *O. radicale* con otras olpidiáceas con esporangios de resistencia de pared lisa, no encuentran diferencias significativas entre ésta y *P. bornovanus* y *O. cucurbitacearum*, y deciden por prioridad seguir denominando a la especie como *O. radicale* y considerar como sinónimos los otros dos nombres. Sin embargo, en el experimento que realizan inoculando el hongo en la gama de hospedadores de distintas familias, utilizadas por Barr, encuentran que éste es capaz de parasitar las raíces de plantas como *Beta vulgaris*, *Brassica oleracea*, *Lactuca sativa*, *Nicotiana clevelandii* y *Trifolium incarnatum* entre otras, a diferencia de los resultados obtenidos por Barr. La descripción que estos autores hacen del hongo es la siguiente:

- Los zoosporangios de *O. radicale* se localizan en las células de la epidermis y en los pelos radicales, varían considerablemente de tamaño y forma (pequeños de 15 μm , desde una forma esférica a una forma ligeramente alargada y casi transparente; y grandes, de 150 μm , un saco esporangial con una apariencia más densa y llenando completamente la célula hospedante). El tubo de salida puede tener una longitud considerable, pero generalmente es corta y poco llamativa. Se han observado un máximo de tres tubos de salida por esporangio. Esta variación en la morfología del esporangio ocurre no solo en diferentes hospedadores, sino en infecciones en el mismo hospedador.
- Las zoosporas completamente formadas son descargadas, vaciando el esporangio en alrededor de unos 30 segundos, tiene una forma generalmente alargada, midiendo 7-8 μm de longitud, pero con forma redondeada; las zoosporas permanecen inmóviles por unos minutos formando una nube fuera del orificio del tubo de salida. No hay ninguna membrana rodeando a las zoosporas en este estadio. La

zoospora se mueve de una forma marcadamente lenta en contraste con la rápida movilidad característica de la mayoría de las zoosporas de los Chytridiales. Se puede enquistar en la superficie de la raíz después de unos minutos o puede permanecer nadando durante varias horas.

- Los esporangios de resistencia del *O. radicale* varían menos en tamaño y forma que los zoosporangios, y tienen un tamaño más reducido. Se pueden encontrar no solo en las células epidérmicas, sino de forma más frecuente en las células corticales de la raíz. La pared del quiste aparece como desigual y bastante fina. Aparentemente el contenido del quiste está compuesto por zoosporas y no se observa ningún tubo de salida (Lange e Insunza, 1977).

Finalmente, Campbell y Sim en 1994 renombran la especie como *O. bornovanus* aludiendo a que los estudios realizados por Sahtiyanci en 1962 de *P. bornovanus* en los que describe las características morfológicas del hongo son los más fiables debido a que fueron realizados a partir de aislados monoesporangiales del hongo, premisa que no fue cumplida por el resto de investigadores que dieron nombre a la especie. De todas formas consideran que los nombres *Pleotrachelus bornovanus* Sahtiyanci, *Olpidium cucurbitacearum* Barr & Dias y *Olpidium radicale* Schwartz & Cook FIDE Lange & Insunza son sinónimos de *O. bornovanus*.

En el mismo trabajo, estos autores trabajando con aislados monoesporangiales establecen además que existe especificidad dentro de *O. bornovanus*, de manera que aislados obtenidos de raíces de plantas de melón se multiplicaron muy bien sobre las distintas variedades de melón inoculadas pero mal sobre las de pepino, mientras que los de pepino se multiplicaban muy bien sobre pepino pero bastante mal sobre melón, mientras que las variedades de sandía se comportaban como hospedadores intermedios de ambos tipos de aislados.

Este mismo comportamiento de diferentes aislados de *O. bornovanus* infectando raíces de diferentes especies de cucurbitáceas fue también descrito por Furuki en 1981.

El comportamiento diferencial de los aislados del hongo, fue corroborado en experimentos posteriores con aislados monoesporangiales procedentes de melón, pepino y sandía. En ellos se puso de manifiesto la dificultad encontrada por los aislados procedentes de melón para infectar las raíces de las plantas de pepino y al contrario, mientras que la sandía se mostró como un hospedador intermedio de ambos aislados. Además, se evidenció la incapacidad de los aislados de melón y pepino para infectar a pepino y melón respectivamente tras varias inoculaciones sucesivas (Guirado *et al*, 2009b).

En otro experimento, realizando inoculaciones con aislados monoesporangiales de *O. bornovanus* sobre una amplia gama de especies de plantas, determinaron que, sólo las raíces de las especies pertenecientes a la familia de las cucurbitáceas, fueron colonizadas por el hongo en mayor o menor medida, por algunos de los aislados utilizados. Sin embargo, no todos los aislados, incluso los obtenidos de la misma especie, se multiplicaron sobre la misma gama de plantas hospedadoras, así, los dos aislados obtenidos de melón se multiplicaron de manera muy distinta, mientras uno lo hizo sobre todas las cucurbitáceas excepto pepino, el otro sólo se multiplicó sobre melón *Lagenaria siceraria* y *Cucurbita ficifolia*. Lo mismo ocurrió con los aislados obtenidos de pepino, dos de ellos tuvieron igual comportamiento, multiplicándose sobre melón, pepino y *C. ficifolia*, mientras que el otro fue capaz de multiplicarse además en sandía, *L. siceraria* y *Cucurbita pepo*. El aislado obtenido de calabacín, se multiplicó muy bien sobre esta especie y, en menor medida, en sandía y calabaza (*Cucurbita maxima*), mientras que el obtenido de sandía infectó melón sandía, *L. siceraria* y *C. ficifolia* (Guirado *et al*, 2009b).

La búsqueda de una especie de cucurbitácea que fuese capaz de multiplicar en igual medida a aislados de *O. bornovanus* procedentes de diferentes especies, fue infructuosa. Todos los aislados monoesporangiales inoculados sólo se multiplicaron en raíces de plantas pertenecientes a la familia de las cucurbitáceas, y ninguno de ellos se multiplicó sobre lechuga, coliflor, trébol rojo ni en ninguna de las demás especies inoculadas (Guirado *et al*, 2009b).

Los resultados de los trabajos realizados en la unidad de Micología del IFAPA de Almería, al inocular sobre la misma gama de especies que aparecen en los trabajos de Barr y Lange & Insuza como hospedadoras de *O. radiale*, indicaron que los aislados detectados en los cultivos hortícolas de Almería son diferentes a los descritos en otras zonas. En este caso los resultados fueron similares a los obtenidos por Barr (1968), estudiando la gama de plantas hospedadoras de aislados de *Olpidium cucurbitacearum*.

Otro aspecto del comportamiento de *O. bornovanus*, es la heterogeneidad encontrada en la infección al observar al microscopio las submuestras realizadas para la determinación de la presencia del hongo en las raíces. Esta heterogeneidad es similar a la encontrada al observar al microscopio las raíces de plantas infectadas en condiciones naturales, en las que existen zonas con una elevada presencia de esporangios en diferentes fases de desarrollo junto con esporangios de resistencia, mientras que en otras zonas, a veces muy próximas entre sí, no hay presencia alguna del hongo, o ésta es escasa, de ahí la dificultad de determinar la presencia del hongo en las raíces en algunas ocasiones. Esto puede indicar que existen otros factores como la edad de la planta o lugares concretos de la raíz que son más susceptibles de ser infectados que otros (Guirado *et al*, 2009b).

La capacidad de *O. bornovanus* para conservarse en el suelo y en las raíces de plantas infectadas durante largos períodos de tiempo ha sido descrita por varios autores: Dias, 1970; Tomlinson y Thomas, 1986; Gómez *et al*, 1993a; Campbell *et al*, 1996 y Guirado *et al*, 2009b. Otros autores han

demostrado, además, su capacidad para diseminarse a través de las aguas de riego (Gómez y Velasco, 1991).

Recientemente, han sido publicados estudios que revelan la capacidad de *O. bornovanus* para causar importantes necrosis radiculares y mermas de producción en plantas de melón inoculadas con un aislado no portador de MNSV, demostrando así la patogenia del hongo por sí solo, pero no su implicación en la muerte súbita del melón (Stanghellini *et al*, 2009; Stanghellini *et al*, 2010).

2.2.3. Virosis transmitidas por las diferentes especies de *Olpidium*. El Virus de las Manchas Necróticas del Melón y su interacción con *Olpidium bornovanus*.

La principal importancia de las especies *O. brassicae* y *O. bornovanus* desde el punto de vista fitopatológico radica en su papel como vectores de virus de plantas.

O. brassicae transmite el virus de la necrosis del tabaco (TNV), el virus del enanismo del tabaco (TSV), el de las venas grandes de la lechuga (LBVV) y el Mirafiori lettuce big-vein virus (MLBVV) (Fry y Campbell, 1966; Hiruki, 1965; Campbell, 1962; Lin *et al.*, 1970), entre otros. Sin embargo, según recientes estudios, es *Olpidium virulentus* y no *O. brassicae* el vector de los virus LBVV y MLBVV (Maccarone *et al.*, 2010), el resto de las asociaciones de virus con *O. brassicae* deberán ser estudiadas más a fondo para determinar que especie es finalmente el hongo vector.

Por su parte *O. bornovanus* es vector de un tobusvirus, varios carmovirus y un dianthovirus entre los que se encuentran el virus de la necrosis del pepino (CNV), el de las manchas necróticas del melón (MNSV), el de las manchas de las hojas del pepino (CLSV), el virus del suelo del pepino (CSBV) y el de la necrosis del calabacín (SqNV) (Dias, 1970; Tomlinson y Thomas, 1986; Campbell *et al.*, 1991).

El virus de las manchas necróticas del melón (*Melon Necrotic Spot Virus*, MNSV), o virus del cribado del melón, fue descrito por Kishi en 1960, pertenece al género *Carmovirus* dentro de la familia *Tombusviridae*. Sus partículas virales son isométricas de 30 nm de diámetro y su genoma es de RNA monocatenario de sentido positivo. Es un virus endémico en los cultivos protegidos de cucurbitáceas de todo el mundo (Lovisoló, 1980).

Han sido descritas tres razas del virus: la japonesa que produce infección sistémica en plantas de melón, la californiana con una gama de hospedadores ligeramente diferente, la europea que infecta sistémicamente a las plantas de pepino pero no a las de melón y otra distinta capaz de producir síntomas sistémicos en sandía tales como necrosis en hojas, tallos y frutos pero incapaz de producir infección sistémica en melón (Antignus *et al.*, 1997).

Aislados de MNSV obtenidos de plantas de sandía en Almería al ser inoculados mecánicamente sobre cotiledones de sandía y melón, evolucionaron a sistémicos en el caso de la sandía pero no en el del melón, así mismo estos aislados produjeron síntomas locales en *Gomphrena globosa*, mientras que los aislados obtenidos de melón y pepino no los produjeron. Serológicamente estos aislados tampoco fueron reconocidos por ninguno de los antisueros comerciales para la detección de MNSV (Mendoza, 1998).

Es transmitido por la semilla en porcentajes comprendidos entre el 10 y el 15% según Kishi (1966), y entre el 1 y el 6% según González-Garza (1979). Ha sido descrito un tipo de transmisión llamado “por semilla mediante vector” cuando la infección ocurre en un suelo infectado por aislados del hongo libres de virus en el cual la única fuente de inóculo es la semilla, y dicha infección no ocurre cuando no se encuentra presente el hongo vector (Furuki, 1981). Posteriormente, Campbell *et al.* (1996), definen el concepto de “transmisión asistida por el vector” ya que según ellos la transmisión por semilla se produce en ausencia del vector y se ve incrementada cuando éste se encuentra presente.

En Almería, también ha sido confirmada la transmisión de MNSV por semillas de melón, al ser detectado en las plantas utilizadas como controles no inoculados del cv Gallicum en experimentos de inoculación con diversos patógenos aislados de cultivos sin suelo de la provincia de Almería tales como MNSV, *O. bornovanus*, *Acremonium* sp., *Monosporascus* sp., *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*, mientras que no fue detectado en ninguna de las plantas de melón de cv Vital nsv/nsv utilizadas en el mismo experimento (Gómez, 1993).

En análisis realizados a partir de plántulas de melón, se confirma la presencia del virus en éstas, sobre todo cuando el análisis se realiza mediante la técnica RT-PCR. Los análisis realizados mediante DAS-ELISA sobre las mismas plantas muestran un nivel más bajo de detección, probablemente debido a la menor sensibilidad de esta última técnica (Herrera-Vásquez, *et al* 2009).

En sandía ocurre lo mismo, se ha confirmado la presencia de MNSV en plantas de sandía utilizadas como controles en experimentos de caracterización de aislados de *O. bornovanus* obtenidos de diferentes hospedadores (melón, pepino, sandía y calabacín), aunque análisis serológicos del lote realizados previamente a dichos experimentos dieron resultados negativos (Guirado *et al*, 2009b). Estos datos, evidencian la falta de sensibilidad de la técnica ELISA para detectar MNSV en semillas también citada por otros autores (González-Garza *et al.*, 1979; Avgelis, 1985; Campbell *et al.*, 1996).

En cuanto a la permanencia de MNSV en las esporas de resistencia del vector existen diferentes opiniones, ya que mientras algunos autores citan que el virus es capaz de permanecer en ellas después de secar las raíces infectadas durante al menos diez semanas (Avgelis, 1985; Tomlinson y Thomas, 1986, Guirado *et al*, 2009a), otros sin embargo, indican que el hongo puede ser liberado del virus mediante varios métodos tales como secar las

raíces infectadas a temperatura ambiente durante más de un mes (Furuki, 1981; Campbell *et al.*, 1991; Campbell y Sim, 1994), o realizar la multiplicación del hongo sobre especies resistentes como *Vigna radiata* o *Benincasa hispida* (Campbell y Sim, 1994; Furuki, 1981).

Ha sido confirmada la presencia del virus en las zoosporas de *O. bornovanus* después de realizar cinco inoculaciones sucesivas con zoosporas en plantas de melón del cv. Primal (nsv/nsv), resistente a MNSV o de ser multiplicado en una especie no sensible a MNSV como el calabacín (Guirado *et al.*, 2009b).

Otro aspecto de la interacción virus-hongo vector es la competencia que parece existir entre la detección de MNSV en plantas infectadas por el hongo y la presencia de éste en el sistema radicular de las mismas, de manera que cuando la detección de MNSV alcanza mayores porcentajes, menor es la presencia del hongo en las raíces, en algunas ocasiones la observación del mismo resulta casi imposible (Guirado *et al.*, 2009a y 2009b). Este tipo de competencia ha sido observado también por otros investigadores tanto en el caso de MNSV, así como en los casos de *O. brassicae* y el virus de la necrosis del tabaco (TNV) y de la necrosis del pepino (CNV) (Campbell *et al.*, 1996).

2.2.4. La enfermedad causada por MNSV y su control.

El Virus de las Manchas Necróticas del Melón o virus del cribado, causa una grave enfermedad en los cultivos de melón y pepino en invernadero en varios países (González-Garza *et al.*, 1979; Avgelis, 1985; Bos *et al.*, 1984; Hibi y Furuki, 1985; Tomlinson y Thomas, 1986; Cuadrado *et al.*, 1993). Los síntomas típicos de la enfermedad son pequeñas manchas cloróticas que evolucionan a necróticas y se desarrollan sobre las hojas más jóvenes aproximadamente dos meses después de la siembra o plantación. En el tallo y sobre los peciolo de las hojas aparecen estrías necróticas. En las hojas

medias pueden aparecer necrosis de los nervios conocidas con el nombre de “enrejado” (Gómez *et al.*, 1993a).

En el hipocotilo aparece una lesión de color marrón claro que sólo afecta a la epidermis y que con frecuencia es el único síntoma de la enfermedad. Las plantas enfermas se marchitan, mueren y detienen drásticamente su crecimiento y las pocas hojas formadas posteriormente son de color verde oscuro y pequeñas con o sin el síntoma del cribado (Gómez *et al.*, 1988). Los síntomas en fruto consisten en manchas necróticas que rodean la periferia interna de los mismos.

En España, el virus también es endémico y también ha habido brotes epidémicos en distintas ocasiones (Cuadrado *et al.*, 1993; Luis-Arteaga, 1994). Su detección en Almería en cultivos de melón fue confirmada en 1986 por Luis Arteaga (Luis, 1986).

Desde 1984 viene afectando y cada vez con mayor importancia a los cultivos protegidos de melón del litoral mediterráneo español. Aunque también recientemente parece extenderse por otras provincias andaluzas, como por ejemplo Granada (Motril, Calahonda, Carchuna y Torrenueva), Córdoba (Almodóvar del Río), Sevilla (Lebrija, San José de la Rinconada) y por otras comunidades como Murcia (Torre Pacheco), Alicante (Pilar de la Horadada) Tenerife e Ibiza, en este último lugar detectado en sandía (Juárez *et al.*, 1993).

La sintomatología de la enfermedad es variada, comienza con pequeñas manchas cloróticas sobre las hojas jóvenes de las plantas que evolucionan a necróticas (“cribado”), en el tallo aparecen estrías necróticas de diferente longitud y que se prolongan a los peciolo de hojas y frutos. Sobre las hojas inferiores e intermedias pueden aparecer necrosis de los nervios (“enrejado”). Sobre la base del tallo aparece una necrosis de color marrón oscuro o claro que parece afectar sólo a la epidermis, pero que si se corta longitudinalmente aparece con tintes marrones en los vasos o completamente deshidratado, éste

es en la mayoría de los casos el único síntoma de la enfermedad en Almería (Cuadrado *et al*, 1993).

En ocasiones los síntomas aparecen precozmente y entonces estas plantas crecen más lentamente y con un color más oscuro con o sin síntomas de cribado. En otros casos, los síntomas aparecen tardíamente, y es entonces, cuando las plantas suelen marchitarse después del cuajado de los frutos, y en otros llegan a morir sin presentar síntoma alguno (Cuadrado *et al*, 1993).

Finalmente, si se extraen las plantas del suelo, el sistema radicular presenta, a veces, un aspecto totalmente sano, y otras aparece de color marrón. La enfermedad apareció tanto en cultivos de siembra directa como de trasplante, entutorados y sin entutorar, en otoño pero sobre todo en primavera, en siembras tardías o tempranas, en suelos desinfectados con bromuro o con metam-Na o sin desinfectar, con riego por goteo o a pie, y con independencia de la precedencia y calidad del agua (Cuadrado *et al*, 1993).

En sandía, las plantas mueren sin llegar a producir frutos (Avgelis, 1989). En España, los síntomas en pepino son similares a los de melón, aunque no suele presentarse necrosis en tallo ni en fruto; sin embargo, puede haber una reducción de la producción (Juárez *et al.*, 1994).

Además, si a los daños ocasionados por MNSV, ya de por sí cuantiosos, se le añaden los causados en el Poniente almeriense, por la muerte súbita del melón, y los gastos dependientes de la utilización, en muchos casos semanal, de productos fungicidas empleados para intentar paliar o prevenir los daños ocasionados por estas enfermedades; de desinfección del suelo con bromuro de metilo o con otros fumigantes; de sustitución de los sacos de sustratos empleados en cultivo hidropónico etc., la suma sería bastante importante (Gómez, com. personal)

En cuanto al control de la enfermedad, uno de los métodos más eficaces consiste en la introducción de la resistencia genética a MNSV, que se ha encontrado en melón controlada por un sólo gen recesivo denominado *nsv*

(Coudriet *et al.*, 1981). El uso de la resistencia genética es muy apropiado, aunque se encuentra con los problemas de su restricción a melón y a la posibilidad de superación por nuevas cepas del virus y su posible ligamiento a caracteres no deseados en las variedades cultivadas. Existen variedades de melón que no muestran síntomas tras la inoculación mecánica con MNSV, como los cultivares de tipo Cantaloup americano 'Improved Gulfstream', 'Perlita', 'Platers Jumbo' y 'PMR-5'; en la línea de mejora WMR29 (16995-M1) y en el melón tipo 'Honey Dew' PMR 61090 (González-Garza *et al.*, 1979).

La resistencia controlada por este alelo recesivo *nsv* en melón es la única descrita para MNSV. En pepino y sandía no se han descrito resistencias a este virus

En Almería el estudio de injertos de melón eficaces para controlar la enfermedad causada por MNSV, en condiciones de cultivo intensivo, parece dar como posibles opciones los porta-injertos RS-841 y *Benincasa cerifera*. Sin embargo, el porcentaje de plantas muertas al final del cultivo no hacen recomendable su utilización en invernaderos comerciales. Dichas muertes podrían deberse a una falta de afinidad total entre los patrones y el cv. Gallicum injertado (Gómez *et al.*, 1993b).

En sandía, el injerto es una práctica habitual en Almería para la lucha contra las enfermedades del suelo, principalmente como *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*, el injerto se realiza sobre híbridos de calabaza (*Cucurbita maxima* x *C. moschata*), como Shintoza y RS-841 (Séminis), Brava, Patrón (Tezier) y Hércules (Ramiro Arnedo) (Camacho, 2003) que, al parecer, también resultan eficaces para el control de MNSV.

El uso de semilla sana constituye un método efectivo para prevenir la infección primaria por MNSV. Prospecciones realizadas en invernaderos de melón, pepino y sandía de la provincia de Almería ponen de manifiesto la presencia de *O. bornovanus* en la mayoría de los invernaderos, así como en el agua de riego, que puede constituir la vía de entrada del hongo (Gómez y Velasco, 1991). En estas condiciones, el uso de semillas contaminadas supone

una fuente de virus para el hongo vector, que lo adquiere a partir de ellas y lo transmite al resto de las plantas.

Sin embargo, los métodos de desinfección de semillas son poco utilizados debido a la dificultad que presenta su eliminación, ya que éste se encuentra en el endospermo de la misma, además de en la cubierta. Se han probado diferentes métodos tanto físicos, como químicos, así como la combinación de ambos. Tradicionalmente se ha utilizado el fosfato trisódico como tratamiento químico capaz de eliminar diferentes virus de las semillas infectadas, sin embargo, en experimentos realizados con una concentración del 10% durante 3h, este producto no ha resultado eficaz para la eliminación de MNSV de semillas de melón. Tampoco han sido eficaces tratamientos con ácido clorhídrico 0,1N durante 30 minutos, al igual que el tratamiento combinado de termoterapia a 70°C durante 120h seguido de la inmersión de las semillas de melón en una solución de fosfato trisódico al 10% durante 3h. La termoterapia, por el contrario es capaz de eliminar el virus de las semillas de melón en un 100%, pero a una temperatura de 70°C durante 144h, tiempos inferiores (72, 96 y 120h) no son efectivos para la eliminación total del virus (Herrera-Vásquez *et al.*, 2009).

Se recomienda realizar la desinfección de los utensilios de poda, en cultivos afectados con fosfato sódico o lejía para evitar transmitir el virus mecánicamente (Blancard *et al.*, 1991).

El control de la enfermedad pasa por el control del hongo vector que puede realizarse mediante desinfección del suelo o solarización, aunque estos métodos han producido resultados variables. Dentro de los métodos de desinfección para eliminar el hongo del suelo, se han citado distintos tratamientos mediante bromuro de metilo, cloropicrina o vapor de agua (Blancard *et al.*, 1991). En cultivos sobre lana de roca conviene esterilizar el sustrato con vapor de agua (Bos *et al.*, 1984); así como evitar la reutilización del sustrato donde se hayan desarrollado plantas enfermas (Blancard *et al.*, 1991).

El bromuro de metilo parece el método más eficaz para controlar el hongo (Gómez *et al*, 1993), sin embargo, bajo las condiciones de cultivo ensayadas, ni si quiera la enérgica actividad del bromuro de metilo fue capaz de eliminar totalmente al hongo del suelo ni de disminuir de forma significativa tanto el porcentaje de plantas colonizadas por el hongo como el número de plantas afectadas por MNSV en cultivos de melón realizados tras los tratamientos de desinfección, por tanto, la disminución del hongo, no produce una disminución de la enfermedad. Por el contrario, el metam-Na no ha mostrado ninguna eficacia en el control del hongo. El formol y la solarización tienen un efecto intermedio entre el bromuro de metilo y el metam-Na (Gómez *et al*, 1993a). Pero, estos experimentos son anteriores a la prohibición internacional del uso del bromuro de metilo, ya no puede ser empleado en los países industrializados desde enero de 2005.

La solarización realizada sobre sacos de perlita infectados por el hongo portador del virus, tampoco es efectiva, ya que no fue capaz de eliminar el hongo tras 30 días, la solarización durante 60 días, tampoco es del todo efectiva, ya que depende de unas condiciones ambientales muy determinadas, sobre todo de temperatura, que no se producen todos los años. (Guirado *et al.*, 2006a). El tratamiento realizado saturando los sacos de perlita con una solución con 3000 ppm de hipoclorito sódico y dejándolos sin cultivar dentro del invernadero durante dos meses en verano, tampoco han resultado efectivo (Guirado *et al.*, 2006a).

Existen diferentes fungicidas y surfactantes, como el cobre, el zinc o la carbendazima, son capaces de matar las zoosporas de *O. brassicae*, en menos de una hora. Además, diferentes tipos de mojantes, entre ellos el Alkyl phenol ethylene oxide (Agral) ®, son tóxicos para las zoosporas del hongo a concentraciones comprendidas entre 1-10µgxml⁻¹ en condiciones de laboratorio (Tomlinson y Faithfull, 1979).

El mojante Agral[®], se ha mostrado efectivo en el control de *O. bornovanus* por su efecto letal sobre las zoosporas del hongo a la concentración de 20 µg/ml con un tiempo de contacto inferior a 5 minutos, concentraciones inferiores de 5, 10, 12.5 y 15 µg/ml del mojante disminuyen la movilidad de las zoosporas (Tomlinson y Thomas, 1986).

En condiciones de cultivo, también está probada la eficacia de Agral sobre la transmisión de MNSV por las zoosporas de *O. bornovanus* en pepino cuando es añadido a la solución nutritiva a la concentración de 20µgxml⁻¹ (Tomlinson y Thomas, 1986).

La efectividad del Agral[®] sobre el control de la infección de *O. bornovanus* también ha sido confirmada en cultivo de melón sobre sustrato de perlita, no detectándose el hongo en las raíces de ninguna de las plantas del tratamiento en el que fue utilizado el mojante añadido a la solución nutritiva utilizada para el riego, a una concentración de 90 ppm y previamente infestada con zoosporas de *O. bornovanus* (Guirado *et al.* 2006b).

También se han mostrado eficaces para el control de las zoosporas del hongo el azoxystrobin (Quadris) y el Agral[®] 90 en cultivo de melón utilizando el sistema de recirculación de la solución nutritiva (Stanghellini, 2010)



Foto 6: Síntomas de MNSV en hojas de pepino.



Foto 7: Síntomas de MNSV en hojas de melón.



Foto 8: Síntomas iniciales de cribado en hojas de sandía.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Análisis de semillas.

Ya que la transmisión del virus a través de la semillas está descrita por varios autores, los dos lotes de semillas utilizados en los experimentos fueron analizados por serología para MNSV con el fin de comprobar si las semillas eran portadoras del virus, ya que de ser así, los resultados de éstos podrían verse alterados.

Las semillas utilizadas pertenecieron a dos lotes diferentes, aunque de la misma variedad “Sugar Baby”, en los dos primeros experimentos se utilizó el mismo lote y en el tercero otro distinto.

Fueron analizadas un total de 300 semillas del lote utilizado en los dos primeros experimentos y 200 del lote utilizado en el último. Para realizar el análisis, se pesaron y trituraron 10 semillas para una de las muestras, a partir de las cuales se realizó la extracción para ser analizada por serología, de cada una de las muestras se hizo una repetición, analizándose 30 muestras en total del primer lote y 20 del segundo.

Para el análisis fue utilizada la técnica serológica ELISA-DAS (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-Double Antibody Sandwich), descrita por Clark y Adams (1977). Se utilizó como soporte insoluble o inmunoabsorbente placas de poliestireno de 96 pocillos de lectura y siguiendo el protocolo de la firma Loewe, suministradora de los antisueros utilizados. El protocolo seguido fue el siguiente:

1).- **Tapizado:** Fijación de anticuerpos específicos del virus MNSV sobre el soporte insoluble o inmunoabsorbente. Se realizó diluyendo los anticuerpos en tampón tapizado, a razón de 1:200, depositando 200 µl en cada pocillo. Se incubaron las placas durante 4 horas a 37°C, tras lo cual se lavaron con

tampón de lavado (PBST) para eliminar los anticuerpos deficientemente fijados o no fijados.

2).- Adición de las muestras: Se prepararon extractos de cada muestra a una dilución 1:20, que constaba de diez semillas trituradas en un mortero cerámico. Cada muestra se diluyó en tampón de extracción y fue triturada con ayuda de un homogeneizador de vástago, se depositaron 200 μ l de este extracto vegetal en cada pocillo.

Fueron preparados extractos de hoja de melón, sanos, para incluirlos como controles sanos en los análisis, depositando tres de estos controles en cada placa. Igualmente, en cada placa fueron incluidos extractos de tejidos infectados por MNSV, como controles positivos.

Se incubaron las placas durante toda la noche a 4°C, tras lo cual se lavaron con el fin de eliminar los restos de muestra no fijados y los antígenos que no reaccionaran.

3).- Adición de anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina: A una dilución de 1:200 en tampón conjugado, y se depositaron 200 μ l en cada pocillo. Se incubaron las placas durante 4 horas a 37°C, tras lo cual fueron lavadas para eliminar los anticuerpos conjugados que no reaccionaron.

4).- Adición del sustrato sobre el cual actúa la fosfatasa alcalina: Se depositaron 200 μ l en cada pocillo de una disolución de para-nitrofenil fosfato en tampón sustrato, a razón de 1mg/ml.

5).- Lectura de las placas: Se realizó con un espectrofotómetro (Multiskan plus), midiendo la absorbancia de cada muestra a 405 nm y pasados entre 15 y 30 minutos desde la adición del sustrato.

En los resultados de los análisis, fue considerada una muestra como positiva cuando su absorbancia superó en dos veces la media de las absorbancias de los controles negativos utilizados en la placa. En todas las placas se utilizaron muestras positivas y negativas para el virus, consistentes en tejido de hipocotilo de plantas sanas e infectadas de melón, ya que no se disponía de semillas de sandía infectadas ni sanas, con total seguridad, que pudieran ser utilizadas como controles.

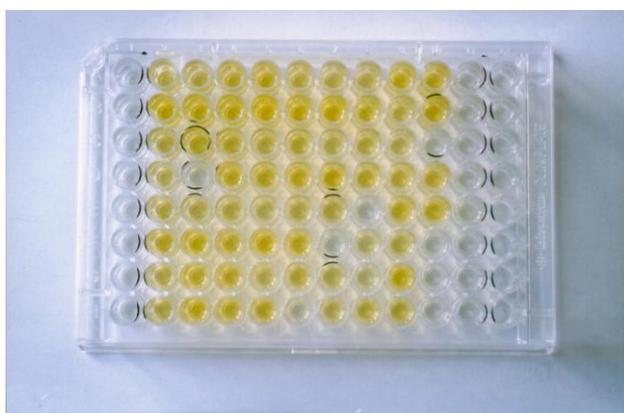


Foto 11: Placa con muestras positivas para MNSV mediante ELISA.

3.2. Realización del semillero.

La implantación del cultivo del segundo experimento se realizó sembrando las semillas de sandía, directamente sobre los sacos de perlita. En los otros dos experimentos (en primavera), el cultivo fue establecido mediante trasplante, para lo que previamente se realizó la siembra en bandejas de alveolos rellenas con una mezcla al 50% de perlita fina y vermiculita en un invernadero de ambiente semicontrolado.

Las características de dicho invernadero son: cubierta de placas de metacrilato con estructura de hierro galvanizado y orientación Este-Oeste, la superficie total de 104 m² (13x8 m), dotado de ventilación cenital,

calefacción por aire caliente, refrigeración por pantalla de evaporación de agua "cooling system" y de automatismos para su gestión.

El semillero se mantuvo en este invernadero durante aproximadamente 25-30 días hasta que se realizó el trasplante en el invernadero en estado de 2-4 hojas verdaderas. La solución nutritiva aportada en este caso fue la siguiente:

Tabla 2: Concentración de nutrientes en la solución nutritiva aportada para el desarrollo del semillero.

Nutriente	Concentración (Mmol/L)
Nitrógeno	11.69
Fósforo	1.50
Potasio	5.84
Azufre	0.50
Magnesio	0.52
Calcio	2.57

3.3. Obtención del inóculo e inoculación de los experimentos.

El inóculo fue obtenido a partir de aislados monoesporangiales de *O. bornovanus* obtenidos en experimentos anteriores realizados por la Unidad de Micología del Centro IFAPA de LA Mojonera (Almería).

Estos aislados se encontraban conservados desde hacía al menos un año en forma de raíces secas infectadas por el hongo. Previamente a su conservación, con cada aislado, habían sido realizadas varias inoculaciones sucesivas con zoosporas sobre melón cv Primal resistente a MNSV, por tanto, se consideró que estos aislados se encontraban libres de MNSV.

Para disponer de una suficiente cantidad de inóculo, se inocularon plantas de melón y pepino dependiendo del aislado a multiplicar (si fue obtenido de melón, pepino o sandía), triturando un volumen equivalente a una cucharada sopera de raíces secas infectadas por el hongo en 150 cc de agua destilada, y regando con 50 cc de este triturado cada una de las macetas. Se inocularon tres macetas con cada uno de los aislados y se mantuvieron durante un mes en el invernadero de ambiente semicontrolado antes descrito.

Las plantas fueron cultivadas en macetas de 1 litro de capacidad en las que se cultivaron dos plantas de cada una de las especies, utilizando como sustrato vermiculita. Cada aislado se inoculó sobre la especie de la cual había sido obtenido, los aislados obtenidos de melón y de sandía se multiplicaron sobre plantas de melón del cv. Regal (nsv/nsv), y los de pepino sobre plantas de pepino del cv. Corona. Entre ellas se insertaron macetas sin inocular para detectar posibles contaminaciones si las hubiere, para evitar éstas además, las macetas se mantuvieron suspendidas.

Además, todas la macetas se envolvieron con tela de muselina para evitar que insectos del género Sciárida, que suelen hacer sus puestas sobre los sustratos, pudieran transmitir el hongo entre diferentes macetas y contaminar así unos aislados con otros. .

Como sistema de riego se utilizó un depósito de 1 m³, donde se preparó la solución final de riego. Mediante una bomba y con la ayuda de uno reloj programable, la solución nutritiva con conductividad eléctrica (C.E.) de 1.9 a 2 dS m⁻¹, fue aportada con un sistema de goteros de 2.4 L/h, con microtubo y piqueta a las plantas. En todos los experimentos se utilizó un agua con una CE de 0.5 a 0.6 dS m⁻¹.

Las plantas se mantuvieron durante un mes en el invernadero y dos días antes de proceder a la inoculación de los experimentos, y previa comprobación de la presencia del hongo en las raíces, se dejaron de regar las plantas para así aumentar la presión osmótica y conseguir que todos los esporangios liberaran las zoosporas al mismo tiempo al ponerlos en contacto con agua. Esta liberación masiva aseguraría una gran cantidad de zoosporas para poder realizar las inoculaciones de los experimentos.

La obtención de las zoosporas se realizó sumergiendo los sistemas radiculares de estas plantas, en un volumen de aproximadamente un litro de agua del grifo de calidad sanitaria comprobada. Pasados aproximadamente 20 minutos, se sacaron las plantas del agua y se procedió a determinar la concentración de zoosporas liberadas mediante su conteo, del cual se realizaron cuatro repeticiones, con la ayuda de una cámara de recuento tipo Thoma. Cuando se hubo determinado la concentración, se ajustó el volumen de suspensión en cada caso y con éste se inocularon las plantas.

La inoculación del experimento se realizó aproximadamente a las dos semanas después del trasplante. En los tres experimentos el método de inoculación empleado fue el de riego al sustrato cerca del cuello de cada planta con una suspensión de entre 10^6 y $4 \cdot 10^6$ zoosporas de *O. bornovanus* en 50 cc de agua corriente.

El cultivo se mantuvo durante dos meses después de la inoculación realizando observaciones semanales del aspecto fitosanitario de las plantas, tras los cuales se procedió a la recolección de frutos y se comprobó la presencia del hongo en las raíces de las plantas. Además cada planta fue analizada para MNSV mediante serología.



Foto12. Detalle de planta de melón en maceta utilizada para la multiplicación de aislados de *Olpidium bornovanus*



Foto13. Vista general del sistema utilizado para suspender las macetas dónde se multiplicaron los diferentes aislados de *Olpidium bornovanus*

3.4. Generales de los experimentos de inoculación

Para comprobar el poder patógeno de *O. bornovanus* sobre sandía se realizaron tres experimentos de inoculación con aislados monoesporangiales del hongo. Dos de los experimentos se realizaron en campaña de primavera y uno en otoño. El diseño experimental utilizado en todos fue el de tres bloques completos al azar con cinco tratamientos. Los cinco tratamientos consistieron en la inoculación de cuatro aislados monoesporangiales de *O. bornovanus*, dos de ellos procedentes de melón, uno de sandía y otro de pepino y un control sin inocular. Se utilizaron 10 plantas de sandía cv. Sugar Baby por parcela elemental, cada una constituida por cinco sacos de perlita tipo B12 con dos plantas en cada saco.

Como testigos se utilizaron el mismo número de plantas sin inocular. Los tratamientos fitosanitarios para las plagas y enfermedades aéreas y las técnicas de cultivo fueron los habituales en la zona. Se determinó, antes de cada experimento, la ausencia de *Pythium* spp. y de *Olpidium* spp. en el agua de riego.

El cultivo se mantuvo durante dos meses después de la inoculación, tras los cuales, se procedió a la recolección de frutos y se comprobó la presencia del hongo en las raíces de las plantas, además cada planta se analizó para MNSV mediante serología.

Se midió la producción de cada uno de los tratamientos de los tres bloques diferenciando entre frutos comerciales y destrío, y se realizó el análisis estadístico de los datos.

3.4.1. Características del invernadero.

Los tres experimentos de patogenia de *O. bornovanus* en sandía han sido realizados en un invernadero tipo túnel de 270 m² con cubierta de polietileno de 200 µm de espesor y con su parte más larga orientada este-oeste, de 4,5 m de altura y situado en el centro IFAPA de LA Mojonera (Almería).

Este invernadero se encuentra dividido en 15 líneas de cultivo separadas desde el suelo hasta una altura aproximada de 70 cm por un film plástico para evitar que se crucen los tallos de plantas de diferentes tratamientos, evitar contaminaciones y facilitar la recolección de los frutos de cada tratamiento.



Foto 9: Vista exterior invernadero túnel



Foto 10: Vista interior invernadero túnel

3.4.2. Tipo de cultivo y sistema de riego.

Las plantas se cultivaron sobre sacos con sustrato de perlita tipo B-12 de dimensiones 120x 20x20 cm con una capacidad de 45 litros a los que se les practicaron una apertura para el drenaje de 5-7 cm de longitud y paralela al suelo a 2-3 cm sobre éste, con idea de evitar posibles contaminaciones. Los sacos de perlita se colocaron sobre una lámina de polietileno con el fin de evitar el contacto directo con el suelo, y entre las líneas de cultivo se colocó verticalmente un film de polietileno para facilitar la cosecha de frutos de los diferentes tratamientos.

Como sistema de riego se utilizó un depósito de 12 m³ de capacidad donde se preparó la solución nutritiva definitiva de entre 1.9 y 2 dS x m⁻¹ de conductividad eléctrica, que fue aportada a cada planta por una bomba con la ayuda de un reloj programable y mediante un sistema de goteros con un gasto de 2,4 l/h con microtubo y piqueta. Se colocaron 3 goteros por saco de perlita, excepto en el saco situado más al sur dónde se colocó un gotero adicional para suplir el gasto producido por la mayor irradiación solar.

Los sacos de perlita fueron saturados con solución nutritiva 48 horas antes de realizar la siembra, o el trasplante, en su caso. El sustrato se regó en base a la cantidad y conductividad eléctrica del agua sobrante (drenaje), mediante bandeja de demanda, manteniendo un volumen de drenaje en torno al 20% y la

conductividad eléctrica de dicha agua siempre menor a los 5 dS x m⁻¹. La solución nutritiva aportada durante el cultivo, fue calculada en función del estado vegetativo del mismo.

Tabla 1: Diferentes concentraciones de nutrientes en la solución nutritiva final aportada al cultivo según los diferentes estados vegetativos.

Nutrientes	Concentración (Mmol/L)		
	Plántula	Floración	Engorde frutos
NO ₃ ⁻	10	10	15
H ₂ PO ₄ ⁻	1.5	2.5	1.5
SO ₄ ⁼	2	3	2
HCO ₃ ⁻	0.5	0.5	0.5
NH ₄ ⁺	2	2	1
K ⁺	3.5	5	5
Ca ⁺⁺	3.5	3	5
Mg ⁺⁺	2	2	2

3.4.3. Detección de *Olpidium bornovanus* y MNSV.

Para comprobar la presencia de *O. bornovanus* en las plantas al final del experimento, se tomaron muestras de las raíces de cada uno de los sacos de cultivo, se llevaron al laboratorio y se lavaron abundantemente con agua del grifo. Posteriormente, se montaron trocitos de raíz de aproximadamente un centímetro de longitud y 1 mm de diámetro en un portaobjetos y se observaron bajo microscopio óptico con 250-400 aumentos. En cada caso se anotó la presencia tanto de esporangios como de esporangios de resistencia del hongo, o su ausencia.

En el caso concreto del segundo experimento, además de detectar la presencia de las estructuras del hongo en las raíces, se contabilizaron tanto los quistes como los esporangios presentes en cada trozo.

La detección de MNSV se realizó mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-DAS antes descrita para el análisis de semillas, analizando tejido del hipocotilo de cada una de las plantas del experimento. Fueron consideradas muestras positivas aquellas en las que el resultado de su absorbancia superó en dos veces la media de las absorbancias de los controles negativos utilizados en la placa.

Al término de los tres experimentos, se analizó una muestra al azar de cinco plantas de cada parcela elemental para detectar la posible infección por el virus de las “venas amarillas” del pepino, Cucumber Vein Yellowing Virus (CVYV), que apareció en la primavera del primer año en que se iniciaron estos experimentos, y que fue considerado posible agente causal de colapso en algunos invernaderos cultivados de sandía en Almería durante la primavera de 2002.

3.4.4. Toma de datos y análisis.

La C.E. y el pH de la solución nutritiva y del agua de drenaje de los sacos de perlita se midieron con un conductímetro y un pHmetro diariamente, para el óptimo seguimiento del cultivo. El volumen de agua de riego se midió en un recipiente que recogía el agua de un gotero y el de drenaje en otro que recogía el agua sobrante de un saco de cultivo colocado en una de las líneas del testigo no inoculado, con ambas medidas fue calculado el porcentaje de drenaje diariamente, y por tanto, el volumen de riego necesario.

Durante los experimentos se realizaron observaciones semanales de los síntomas aparecidos en las plantas, consistentes fundamentalmente en necrosis de hipocotilo, estrías necróticas sobre el tallo, manchas necróticas en las hojas y marchitez y muerte de las plantas. La producción comercial y total de frutos se valoró mediante pesada con un dinamómetro y el conteo del número de frutos recolectados.

Además, en los dos últimos experimentos, al término del cultivo, se realizó una valoración del aspecto sanitario del sistema radicular, con el siguiente criterio:

- De 0 a 1: planta con el sistema radicular sin necrosar a planta con un 25% del sistema radicular necrosado.
- De 1 a 2: planta con un porcentaje del sistema radicular necrosado comprendido entre el 25 y 50%.
- De 2 a 3: planta con un porcentaje del sistema radicular necrosado comprendido entre el 50 y 75%.
- De 3 a 4: planta con un porcentaje del sistema radicular necrosado comprendido entre el 75 y 100%.

También se valoró el volumen de raíces en función del sistema radicular de las plantas control no inoculadas, utilizando una escala similar a la anterior:

- De 0 a 1: plantas con un sistema radicular igual o muy similar al de las plantas control (desde 0 hasta un 25% de diferencia)
- De 1 a 2: plantas con un sistema radicular un poco mermado con respecto a las plantas control (entre 25 y 50% de diferencia)
- De 2 a 3: plantas con un sistema radicular mermado con respecto a las plantas control (entre 50 y 75% de diferencia)
- De 3 a 4: plantas con un sistema radicular muy mermado con respecto a las plantas control (entre 75 y 100% de diferencia)

El estudio estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza. Las comparaciones entre las medias se realizaron por el método de la menor diferencia significativa (LSD), para un nivel de confianza del 95%.

Los datos de las observaciones sobre los síntomas de necrosis de hipocotilo se transformaron mediante la función arco seno de la raíz cuadrada

del porcentaje de hipocotilos con chancro, al igual que los datos de detección de MNSV por serología. En cuanto a la necrosis de raíces, cantidad de raíz, presencia de *Olpidium bornovanus* en las raíces y número de frutos producidos se transformaron mediante la raíz cuadrada del valor asignado para la expresión de síntomas más un medio $(x + 1/2)^{1/2}$.

Los datos relativos a las observaciones de síntomas se transformaron mediante el arco seno de la raíz cuadrada del porcentaje y los relativos a la producción de las plantas se realizaron mediante una escala logarítmica de los pesos.



Foto 14: Detalle de la recogida de volumen de riego y de drenaje

3.5. De cada experimento.

3.5.1. Primer experimento

La siembra se hizo 45 días antes del trasplante definitivo a los sacos de perlita realizado el 31 de marzo, y las plantas fueron inoculadas el 15 de abril, en estado de ocho hojas verdaderas. El cultivo se dio por finalizado aproximadamente dos meses después de la inoculación. En este experimento, se inocularon dos aislados obtenidos de melón, uno de sandía y uno de pepino.

El código, especie de la que se han obtenido, procedencia y huésped usado en la multiplicación previa de los aislados inoculados se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3: Procedencia y multiplicación de los aislados inoculados en el primer experimento.

Código	Especie	Procedencia	Huésped para multiplicación
Or-201-ssP	Melón	Israel	Melón cv Regal
Or-205-ssP	Melón	Almería	Melón cv Regal
Or-211-ss	Pepino	Almería	Pepino cv Corona
Or-234-ssP	Sandía	Almería	Melón cv Regal

En este experimento se obtuvieron resultados correspondientes a los porcentajes de plantas marchitas, de plantas muertas, con necrosis del hipocotilo, con presencia de *O. bornovanus* en el sistema radicular y plantas con valores positivos para MNSV mediante serología. Además se determinaron tanto la producción total como la comercial de frutos de cada tratamiento.

3.5.2. Segundo experimento

En este caso se realizó siembra directa de las semillas de sandía en los sacos de cultivo el 22 de agosto. Las plantas se inocularon el 18 de septiembre en estado de diez hojas verdaderas. El cultivo se dio por finalizado 67 días después, el 16 de noviembre. Todos los aislados inoculados en este experimento fueron obtenidos de plantas de melón y, al igual que los inoculados en el primero, pasados por largos períodos de secado e inoculados consecutivamente cinco veces con zoosporas en plantas de melón cv. Primal resistente a MNSV.

En la siguiente tabla se especifican los códigos de los aislados y su procedencia:

Tabla 4: Procedencia y multiplicación de los aislados inoculados en los experimentos segundo y tercero.

Código	Especie obtención	Procedencia
Or-201-ssP	Melón	Israel
Or-202-ssP	Melón	Israel
Or-205-ssP	Melón	Almería
Or-237-ssP	Melón	Almería

3.5.3. Tercer experimento

El trasplante al invernadero se realizó el seis de marzo, y las plantas fueron inoculadas quince días después en estado de ocho hojas verdaderas. El cultivo finalizó 66 días después de la inoculación, el 27 de mayo. Se utilizaron los mismos aislados que fueron inoculados en el segundo experimento (Tabla 4).

Y, al igual que en el anterior experimento, en esta ocasión, además se realizó valoración del sistema radicular de cada planta, se valoraron tanto la necrosis como el volumen aparente del sistema radicular de cada planta con una escala de 0 a 4.

4. RESULTADOS

4.1. De los análisis de semillas.

En los análisis serológicos realizados a 300 semillas del lote utilizado en los dos primeros experimentos y 200 del lote utilizado en el último, de sandía del cv. Sugar Baby, mediante la técnica ELISA-DAS, no hubo ninguna muestra que resultara positiva para MNSV, por tanto, en principio se partía de semillas libres del virus.

4.2. De los experimentos de patogeneicidad.

4.2.1. Primer experimento

La concentración final de zoosporas obtenida mediante liberación masiva a partir de las raíces de las plantas utilizadas para multiplicar cada uno de los aislados monoesporangiales, y la cantidad con la que fue inoculado cada uno de los tratamientos quedan reflejadas en la siguiente tabla:

Tabla 5. Zoosporas obtenidas y utilizadas para inocular cada tratamiento

Tratamiento/Aislado	Concentración (zoosporas/ml)	Cantidad en 50 cc
Ob-201-ssP	$8 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^6$
Ob-205-ssP	10^4	$5 \cdot 10^5$
Ob-211-ss	10^4	$5 \cdot 10^5$
Ob-234-ssP	10^4	$5 \cdot 10^5$

En la siguiente tabla, se resumen los resultados obtenidos en este experimento:

Tabla 6. Patogenia de *O. bornovanus* en sandía (primer experimento)

Aislados	PS	PM	NH	O. b.	+MNSV	PT/pl	PC/pl
Ob-201-ssP	0.0	0.0	0.0	100.0	23.0 a	5.15 a	3.82 a
Ob-205-ssP	0.0	0.0	0.0	100.0	3.0 a	6.19 a	4.98 a
Ob-211-ss	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0 a	5.65 a	4.58 a
Ob-234-ssP	0.0	0.0	0.0	100.0	6.0 a	8.03 a	7.18 a
Testigo	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0 a	6.06 a	5.00 a

Porcentaje de plantas con síntomas (PS), muertas y marchitas (PM) y con necrosis de hipocotilo (NH). Porcentaje de plantas con *O. bornovanus* (O. b.) en el de sistema radicular. Porcentaje de plantas positivas para MNSV (+MNSV) y producción total (PT/pl) y comercial (PC/pl) en Kg/planta. Valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (P=0.05).

Como se puede observar en la tabla 6, *Olpidium bornovanus* fue detectado en las raíces de todas las plantas inoculadas, pero nunca en las raíces de las plantas del tratamiento no inoculado.

Aunque todas las plantas infectadas con el hongo mostraron necrosis más o menos importantes en el sistema radicular (no valoradas en este experimento), ninguno de los aislados de *O. bornovanus* ensayados causó síntomas de marchitez, necrosis en la base del tallo o la muerte de las plantas inoculadas, ni tampoco mostraron síntomas de infección por MNSV tales como cribado en hojas, estrías en tallos o peciolo o enrejado. Los frutos tampoco mostraron ningún síntoma.

El virus de las manchas necróticas del melón se detectó en el 23, 3 y 6% de las plantas inoculadas con los aislados 201, 205 y 234, respectivamente, multiplicados sobre melón cv Regal (nsv/nsv). El virus no fue detectado en las plantas inoculadas con el aislado 211 multiplicado sobre de pepino cv Corona.

Asimismo, el virus fue detectado en el 20% de las plantas del tratamiento no inoculado, aunque este dato no fue significativamente diferente de los obtenidos para las plantas inoculadas en el resto de tratamientos.

Con respecto a la producción de frutos, el análisis de la varianza reveló que tampoco existieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, tanto para la producción total como para la comercial, para un nivel de confianza del 95%.

Al término del experimento y en todas las plantas analizadas se detectó además el virus de “las venas amarillas” del pepino (Cucumber Vein Yellowing Virus) (CVYV).

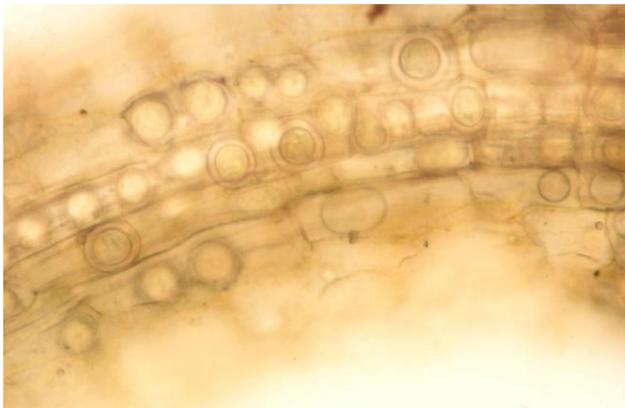


Foto 15: Esporangios de resistencia de *O. bornovanus* al microscopio óptico

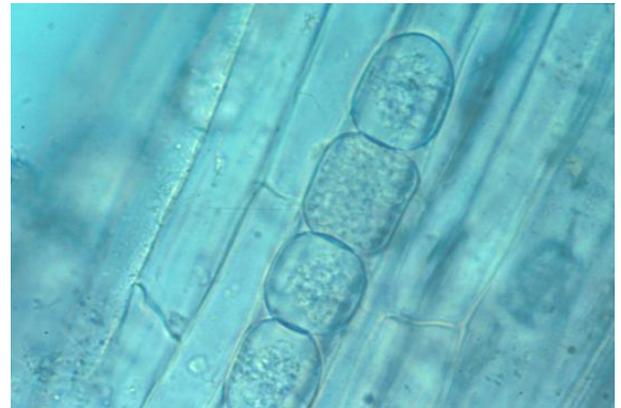


Foto 16: Esporangios de *O. bornovanus* bajo microscopio óptico

4.2.2. Segundo experimento

En este experimento, todas las plantas fueron inoculadas con la cantidad de 10^6 zoosporas en 50cc de agua corriente, de cada uno de los aislados de *O. bornovanus* que se utilizaron en el experimento.

Los resultados obtenidos, se encuentran reflejados en la siguiente tabla:

Tabla 7. Patogenia de *O. bornovanus* en sandía en el segundo experimento

Aislados	PS	PM	NH	NR	VRA	O. b.	+MNSV	PC/pl
Or-201-ssP	0.0	0.0	100.0 a	1.00 c	2.73 b	1.06 b	100.0 a	5.13 a
Or-202-ssP	0.0	0.0	7.0 b	2.00 a	4.00 a	4.00 a	47.0 c	5.27 a
Or-205-ssP	0.0	0.0	80.0 a	1.16 b	2.73 b	0.80 b	88.0 b	4.91 a
Or-237-ssP	0.0	0.0	97.0 a	1.06 bc	2.33 b	1.33 b	100.0 a	5.38 a
Testigo	0.0	0.0	3.5 b	0.00 d	3.90 a	0.00 c	17.0 d	4.31 a

Porcentaje de plantas con síntomas (PS), muertas y marchitas (PM) y con necrosis de hipocotilo (NH). Necrosis observadas (NR) y volumen aparente (VRA) del sistema radicular. Valoración del número de esporangios y quistes de *O. bornovanus* en el sistema radicular (O. b.). Porcentaje de plantas positivas a MNSV (+MNSV) y producción comercial en Kg/planta (PC/pl). Valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (P=0.05).

En este experimento, ninguno de los aislados de *O. bornovanus* causó síntomas de marchitez o la muerte de las plantas inoculadas. Sin embargo, tres de los aislados inoculados: 201, 205 y 237 causaron en un alto porcentaje de las plantas síntomas de necrosis en la base del tallo que fueron del 100.0, 80.0 y 97.0%, respectivamente. Todos estos valores fueron significativamente diferentes con respecto a las plantas no inoculadas (foto 19). Por el contrario, las diferencias obtenidas entre las necrosis del hipocotilo de las plantas inoculadas con el aislado 202 y las de las plantas no inoculadas, no fueron significativas.

Los cuatro aislados de *O. bornovanus* causaron necrosis en el sistema radicular, el más agresivo fue el 202 (con índice de 2.0), los restantes causaron una necrosis moderada del sistema radicular con índices comprendidos entre 1.0 y 1.16, todos significativamente diferentes del testigo no inoculado en el que no se observó este síntoma (fotos 20 a 23).

Además, tres de los aislados inoculados: 201, 205 y 237 ocasionaron una disminución estadísticamente significativa del volumen aparente del sistema radicular. Por el contrario el volumen del sistema radicular de las plantas inoculadas con el aislado 202 no fue diferente al de las plantas no inoculadas.

Olpidium bornovanus se detectó en las raíces de todas las plantas inoculadas con los distintos aislados, aunque la cantidad de esporangios y de quistes del hongo observados en el sistema radicular fue variable dependiendo del aislado inoculado. El aislado que se multiplicó mejor fue el 202, en el que se observó un índice de 4.0, es decir, la cantidad de quistes y esporangios en las raíces de las plantas fue muy alta. Los otros tres aislados se multiplicaron con índices comprendidos entre el 0.8 y 1.33, significativamente diferentes de del índice del aislado 202.

Ninguno de los aislados de *O. bornovanus* ensayados causó síntomas de cribado en hojas, estrías en tallos o peciolo o enrejado. Los frutos tampoco mostraron ningún síntoma.

En este experimento volvió a ser positiva la detección de MNSV de las plantas testigo, aunque en sus raíces no se detectó la presencia de *Olpidium bornovanus*.

Aunque el virus del cribado no se detectó por serología en ninguna de las 300 semillas analizadas del lote utilizado en el experimento y los cuatro aislados de *O. radiale* se habían considerado como no portadores del virus, el MNSV se detectó en el 100.0, 47.0, 88.0 y 100.0% de las plantas inoculadas con los aislados 201, 202, 205 y 237, respectivamente, todos estos valores

fueron significativamente diferentes con respecto al testigo en el que el virus fue detectado en el 17% de las plantas.

Con respecto a la producción de frutos, ninguno de los aislados fue capaz de mermar la producción total o comercial. Las producciones totales de frutos oscilaron entre los 5.38 Kg por planta del aislado 237 y los 4.31 Kg de media producidos por las plantas testigo, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Al término del experimento y en todas las plantas analizadas se volvió a detectar el virus de “las venas amarillas” del pepino (Cucumber Vein Yellowing Virus) (CVYV).

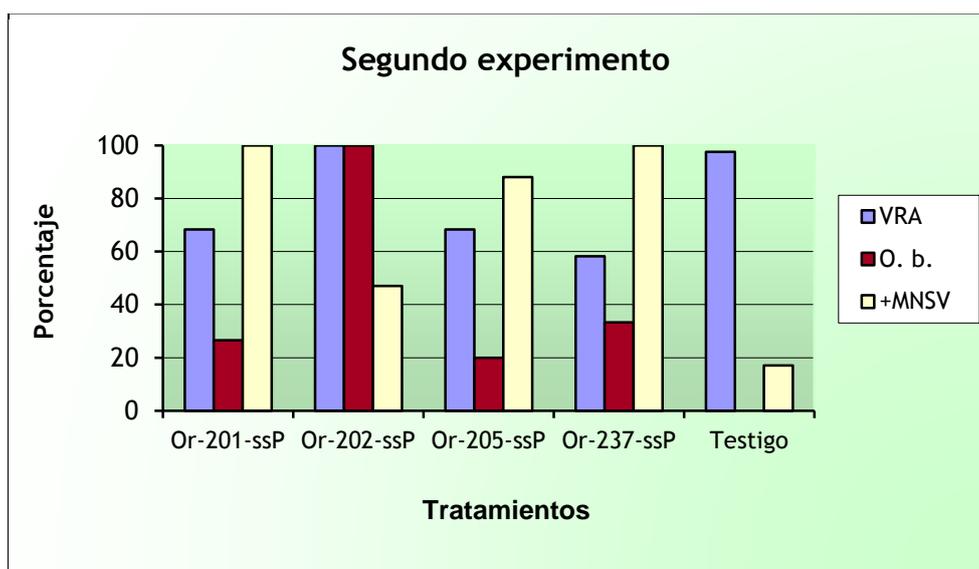


Figura 1: Volumen del sistema radicular y detección de *Olpidium bornovanus* y MNSV en cada uno de los aislados inoculados en el experimento



Foto 17: Aspecto de plantas de sandía inoculadas con el aislado 201 (derecha) y no inoculadas (izquierda).



Foto 18: Chancro en hipocotilo.



Foto 19: Sistema radicular de plantas inoculadas con el aislado 201 y no inoculada (centro).



Foto 20: Sistema radicular de plantas inoculadas con el aislado 202 y no inoculada (izquierda).



Foto 21: Sistema radicular de plantas inoculadas con el aislado 205 y no inoculada (derecha).

Foto 22: Sistema radicular de plantas inoculadas con el aislado 237 y no inoculada (centro).

4.2.3. Tercer experimento

En este experimento, al igual que en el anterior, todas las plantas fueron inoculadas con la misma cantidad de zoosporas, aunque en este caso fue de 2×10^6 en 50cc de agua corriente, de cada uno de los aislados de *O. bornovanus* que se utilizaron en el experimento.

Los resultados del experimento se encuentran reflejados en la siguiente tabla:

Tabla 8. Patogenia de *O. bornovanus* en sandía en el tercer experimento

Aislados	PSis	PM	NH	NR	VRA	O. b.	+MNSV	PC/pl
Or-201-ssP	76.7 a	47.6 a	100,0 a	1.50 a	1,57 c	10,0	100,0 a	1,90 b
Or-202-ssP	0.0 b	0.0 b	30,0 b	0.33 b	2,47 b	100,0	36,7 bc	3,32 a
Or-205-ssP	0.0 b	0.0 b	26,7 b	0.30 b	1,97 bc	100,0	76,7 ab	2,57ab
Or-237-ssP	0.0 b	0.0 b	56,7ab	0.37 b	1,93 bc	100,0	60,0 ab	2,94 a
Testigo	0.0 b	0.0 b	10,0 b	0.03 b	3,97 a	0.0	0,0 c	2,94 a

Porcentaje de plantas con síntomas sistémicos (**PS**), de plantas muertas y marchitas al término del experimento (**PM**) y con síntomas de necrosis de hipocotilo (**NH**). Necrosis (**VRA**) y volumen (**CR**) y presencia de *O. bornovanus* (**O. b.**) en el de sistema radicular. Porcentaje de plantas positivas a MNSV (**+MNSV**) y producción comercial en Kg-planta⁻¹ (**PC/pl**). Valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (P=0.05).

Como se puede observar en la tabla, en este experimento, un alto porcentaje (el 76.7%) de las plantas inoculadas con el aislado 201 manifestaron síntomas sistémicos del virus de las manchas necróticas del melón, consistentes en estrías necróticas sobre los tallos y pecíolos de las hojas, necrosis de las nerviaciones de las hojas, manchas necróticas sobre las hojas del ápice, y la marchitez y posterior muerte del 46.7% de las plantas inoculadas. Por el contrario, en las plantas inoculadas con los tres aislados restantes y en las plantas del testigo no inoculado no se observaron estos síntomas.

La necrosis del hipocotilo se observó en todas las plantas inoculadas con el aislado 201 y en el 30, 26.7 y 56.7 % de las plantas inoculadas con los aislados 202, 205 y 237, respectivamente. También la necrosis del hipocotilo se observó en el 10% de las plantas del testigo. Solamente las diferencias observadas entre las causadas por el aislado 201 y las observadas en las parcelas del testigo fueron estadísticamente significativas.

El aislado 201 causó también (con índice de 1.5) necrosis en el sistema radicular. El resto de los aislados no causaron necrosis que fueran significativamente diferentes de las observadas en las plantas del testigo. Los cuatro aislados de *O. bornovanus* ocasionaron una disminución estadísticamente significativa del volumen aparente del sistema radicular. El aislado que ocasionó una mayor reducción fue también el 201. Las diferencias observadas con respecto a este aislado no fueron estadísticamente significativas con las de los aislados 205 y 237, aunque si las fueron con respecto al aislado 202 y al testigo sin inocular.

Olpidium bornovanus se detectó sólo en el 10.0% de las plantas inoculadas con el aislado 201, y en todas las plantas inoculadas con los aislados 202, 205 y 237. El hongo no se detectó en las plantas de las parcelas del testigo. Además, los cuatro aislados del hongo, asociados a la presencia del virus causaron una significativa reducción del volumen radicular aparente.

El virus de las manchas necróticas del melón se detectó en porcentajes del 100.0, 36.7, 76.7 y 60.0% de las plantas inoculadas con los aislados 201, 202, 205 y 237, respectivamente. En este experimento el virus no se detectó en ninguna de las plantas de las parcelas del testigo. Las diferencias obtenidas entre el porcentaje de plantas con MNSV en las parcelas inoculadas con los aislados 201, 205 y 237 fueron estadísticamente significativas con respecto a los observados en las parcelas del testigo. Al término del experimento y en

todas las plantas analizadas se detectó además el virus de “las venas amarillas” del pepino (Cucumber Vein Yellowing Virus) (CVYV).

Con respecto a la producción comercial de frutos, esta osciló entre los 3.32 Kg·planta⁻¹ en las parcelas inoculadas con el aislado 202 y los 1.9 Kg·planta⁻¹ en las inoculadas con el aislado 201. La producción media de las plantas del testigo no inoculado alcanzó sólo los 2.95 Kg·planta⁻¹. Solamente, las diferencias obtenidas, del 35.4%, entre la producción de las parcelas inoculadas con el aislado 201 y las del testigo fueron estadísticamente significativas.

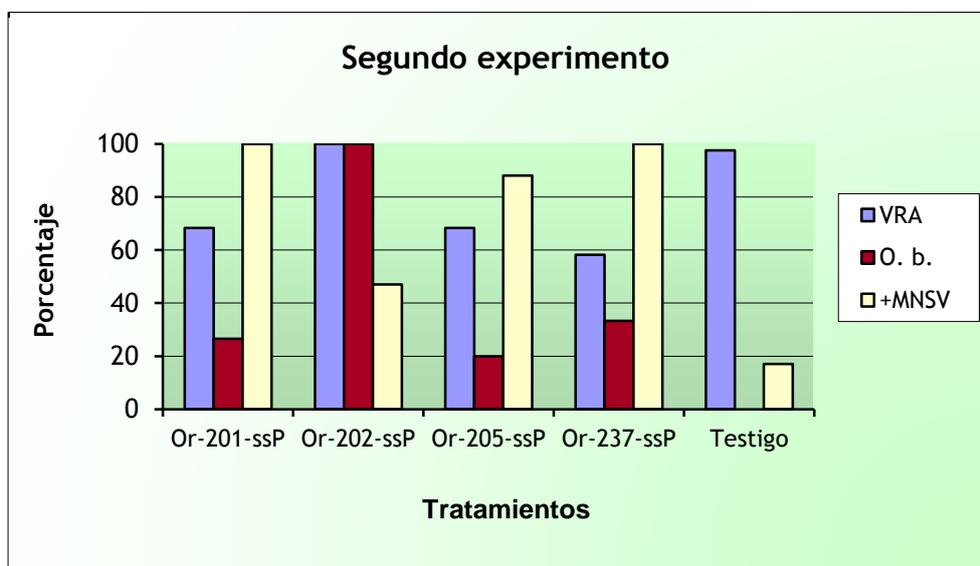


Figura 2: Volumen del sistema radicular y detección de *Olpidium bornovanus* y MNSV en cada uno de los aislados inoculados en el experimento



Foto 23: Manchas cloróticas en hojas causadas por MNSV.



Foto 24: Estrías necróticas causadas por MNSV en tallos.



Foto 25: Estrías necróticas en las nerviaciones de las hojas ("enrejado").



Foto 26: Chancro en hipocotilo



Foto 27: Marchitez



Foto 28: Sistema radicular de plantas inoculadas con el aislado 201 y no inoculada.



Foto 29: Sistema radicular de plantas inoculadas con el aislado 202 y no inoculada.



Foto 30: Sistema radicular de plantas inoculadas con el aislado 205 y no inoculada.



Foto 31: Sistema radicular de plantas inoculadas con el aislado 237 y no inoculada.

5. DISCUSIÓN

Las inoculaciones realizadas, con dosis de $5 \cdot 10^5$ a $4 \cdot 10^6$ zoosporas por planta, fueron efectivas para causar la infección de las raíces por el hongo, ya que los seis aislados ensayados de *O. bornovanus*, cuatro obtenidos de melón, uno de pepino y otro de sandía, fueron capaces de infectar entre el 90.0 y el 100% de las plantas de sandía inoculadas. La infección de las raíces de plantas de sandía inoculadas con 4 aislados obtenidos de melón y uno de pepino apoyan los resultados obtenidos por varios autores (Furuki, 1982; Campbell y Sim, 1994 Guirado *et al.*, 2009 a) que indican que la sandía se comporta como hospedador intermedio de los diferentes aislados del hongo.

A pesar de haber realizado las inoculaciones experimentales sobre plantas, procedentes de dos lotes de semillas seronegativas para el virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), y con aislados de *O. bornovanus* obtenidos de un solo esporangio y multiplicados repetidas veces sobre una variedad de melón (Primal) resistente a MNSV (Guirado *et al.*, 2009b), el virus se detectó en porcentajes muy amplios, entre el 0.0 y 100% de las plantas inoculadas, y variables para un mismo aislado en los diferentes experimentos realizados.

De los resultados obtenidos se pueden deducir algunas conclusiones epidemiológicamente importantes:

a) La trasmisión del MNSV por la semilla de sandía y la ineficacia de la técnica serológica utilizada para detectar en semilla el virus. El MNSV se detectó en los dos primeros experimento realizados en las plantas del testigo no inoculado y no contaminado con *O. bornovanus*. Aunque esta contaminación podía deberse al contacto entre las hojas del testigo con plantas de otros tratamientos infectadas con MNSV -la transmisión por contacto del MNSV fue citada sin aportar pruebas experimentales por Lecoq y Pitrat (1980) y por Blancard *et al.*,(1991)-, esto parece improbable en

nuestros experimentos por tres motivos: Por la separación con film plástico existente entre las líneas de cultivo, por la situación concreta de las plantas infectadas en el invernadero (alejadas de las plantas seropositivas para MNSV, y por los resultados obtenidos en otros experimentos anteriores con melón y sandía, que no avalan la transmisión por contacto del MNSV (Gómez, 1993; Guirado *et al.*, 2009a). La ineficacia de la técnica serológica utilizada para detectar el virus de las manchas necróticas en semillas del melón ha sido citada por varios investigadores (González-Garza *et al.*, 1979; Avgelis, 1985; Campbell *et al.*, 1996; Herrera-Vásquez, 2009), y sugerida por nosotros en las semillas de sandía (Guirado *et al.*, 2009b).

b) La conservación de MNSV en los esporangios de resistencia de *O. bornovanus*. El inóculo inicial, que posteriormente se comportó como portador de MNSV, se obtuvo de raíces secas con esporangios de resistencia de *O. bornovanus* conservadas en tubos de vidrio por un periodo de tiempo superior a los 30 días en la micoteca de la Unidad de micología del Centro IFAPA-La Mojonera. La conservación de MNSV en los esporangios de resistencia de *O. bornovanus* coincide con los resultados obtenidos por algunos investigadores (Avgelis, 1985; Tomlinson y Thomas, 1986) y con los obtenidos por nosotros en otros experimentos (Guirado *et al.*, 2009a). Y están en desacuerdo con los obtenidos por otros que indican que el hongo puede ser liberado del virus secando las raíces de las plantas infectadas a temperatura ambiente durante más de un mes (Furuki, 1981; Campbell *et al.*, 1991; Campbell y Sim, 1994).

Y c) Que el MNSV no se elimina de *O. bornovanus* después de varias inoculaciones consecutivas multiplicándose sobre una variedad de melón resistente a MNSV.

A pesar de la estrecha asociación, detectada en dos de los experimentos realizados, entre la presencia de *O. bornovanus* y la existencia de necrosis más o menos importantes en el sistema radicular, los experimentos planteados no han servido para concluir que el hongo por sí sólo cause necrosis del sistema radicular, marchitez o muerte de las plantas,

debido a la importante contaminación por el virus en la mayoría de los tratamientos. El poder patógeno de *O. bornovanus* sobre melón ha sido citado por varios investigadores (Gómez, 1993; Campbell y Sim, 1994), y muy recientemente por Stanghellini *et al*, 2010).

Por los mismos motivos, tampoco se ha podido probar la capacidad de *O. bornovanus*, sin su asociación con MNSV, para causar el síndrome de muerte súbita de la sandía.

Como se ha apuntado anteriormente, la infección de las plantas por *O. bornovanus* llevó casi siempre emparejada la infección de las plantas por el virus del cribado. Aunque el porcentaje global de plantas infectadas fue muy variable para los diferentes experimentos, del 0 al 23% para el primer experimento, del 47.0 al 100% en el segundo, y del 36 al 100% en el tercero, e incluso para un mismo aislado en los distintos experimentos, así, el aislado 201 fue capaz de transmitir el virus al 23.0, 100.0 y 100.0%, y el 205 al 3.0, 88.0 y 76.7% de las plantas en el primer, segundo y tercer experimento, ambos respectivamente. Con todo esto, se pone de manifiesto que la gravedad de la enfermedad causada por *O. bornovanus* cuando es portador de MNSV parecen depender de determinadas condiciones ambientales determinadas que no parecen repetirse en todos los experimentos realizados, observaciones coincidentes con las obtenidas en experimentos anteriores (Guirado *et al*, 2009a).

La necrosis del hipocotilo fue el síntoma más frecuentemente observado, y estuvo siempre asociado a plantas seropositivas para MNSV. Los mayores porcentajes de este síntoma se dieron en los tratamientos que presentaron los mayores porcentajes de infección por MNSV, llegando hasta el 100% en los tratamientos inoculados con el aislado Ob-201-ssP en los dos últimos experimentos, y con valores comprendidos entre el 7 y 97% en el resto de tratamientos en ambos experimentos. Sin embargo, este síntoma no fue observado en ninguno de los tratamientos realizados en el primer experimento, por tanto, de nuevo se confirma el hecho de que los síntomas

causados por la inoculación de *O. bornovanus* cuando es portador de MNSV, son observados bajo condiciones ambientales muy determinadas que no parecen repetirse en todos los experimentos y que coinciden con los observados por Guirado *et al.*, 2009a.

O. bornovanus causó en las plantas inoculadas necrosis del sistema radicular y, con excepción del aislado Ob-202-ss en el segundo experimento, una disminución importante de su aparente volumen.

En las observaciones realizadas parece existir cierta relación entre la cantidad de esporangios y esporangios de resistencia de *O. bornovanus* en el sistema radicular de las plantas y su infección por el MNSV. De tal manera que cuando los síntomas causados por el virus son fuertes la multiplicación del hongo es escasa y su detección difícil. Por el contrario, cuando las plantas no están infectadas con el virus, o sus síntomas son leves, el hongo se multiplica profusamente y su detección es fácil. Estas observaciones coinciden con las realizadas anteriormente en otros experimentos con sandía (Guirado *et al.*, 2009a) y con las realizadas por otros investigadores para los binomios *O. bornovanus* y MNSV, y *O. brassicae*, con el virus de la necrosis del pepino (CNV) y con el de la necrosis del tabaco (TNV) (Campbell *et al.*, 1996).

La producción de frutos de sandía fue en todos los experimentos escasa en relación a la obtenida en experimentos de años anteriores. Posiblemente la presencia en todas las plantas analizadas del virus de “las venas amarillas del pepino” (Cucumber Vein Yellowing Virus) (CVYV), podría explicar esta baja producción.

Finalmente, los resultados obtenidos indican nuevamente el poder patógeno de *Olpidium bornovanus* sobre sandía cuando éste es portador del Virus de las Manchas Necróticas del Melón, causando, según aislados y condiciones ambientales, la reducción del volumen aparente del sistema radicular, necrosis de las raíces, necrosis en la base del tallo, estrías necróticas sobre los tallos y pecíolos de las hojas, necrosis de las nerviaciones

de las hojas, manchas necróticas sobre las hojas del ápice y la marchitez y posterior muerte de las plantas, reduciendo significativamente la producción. Sintomatología similar a la causada por la infección de *O. bornovanus* cuando es portador de MNSV en melón (Cuadrado *et al.*, 1993) y en sandía (Guirado *et al.*, 2009a).

6. CONCLUSIONES

- 1.- La inoculaciones realizadas con cantidades de inóculo comprendidas entre $5 \cdot 10^5$ a $4 \cdot 10^6$ zoosporas por planta fueron efectivas para causar la infección de las plantas por el hongo.
- 2.- El secado de las raíces infectadas por *O. bornovanus* durante largos períodos de tiempo, no ha sido eficaz para liberar al hongo del virus.
- 3.- Las inoculaciones sucesivas con las zoosporas del hongo en variedades resistentes al MNSV, tampoco han resultado efectivas para eliminar el virus del hongo.
- 4.- La infección de las plantas por *O. bornovanus* llevó casi siempre emparejada la infección de las plantas por MNSV.
- 5.- Se pone de manifiesto el poder patógeno de *Olpidium bornovanus* cuando éste es portador del Virus de las Manchas Necróticas del Melón, causando según aislados y condiciones ambientales, reducción del volumen aparente del sistema radicular, necrosis de las raíces, necrosis en la base del tallo, estrías necróticas sobre los tallos y pecíolos de las hojas, necrosis de las nerviaciones de las hojas, manchas necróticas sobre las hojas del ápice y la marchitez y posterior muerte de las plantas.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Alexopoulos, C.J and Mims C.W. 1985. Introducción a la Micología. Ed. Omega. ISBN:84-282-0747-X.
- AlfaroGarcía, A., Armengol, J., Bruton, B.D., Gams, W., García-Jiménez, J. y Martínez Ferrer, .G. 1996. The taxonomic position of the causal agent of acremonium collapse of muskmelon. *Mycologia* 88:804-808.
- Antignus, Y., Pearlsman, M., O. Lachman and S. Cohen. 1997. Molecular and biological Characterization of melon necrotic spot virus (MNSV) infecting melons and watermelons in Israel. *Phytoparasitica* 25: (3) 245-246.
- Armengol, J., Martínez Ferrer, G., Sanz, R., Bruton, B.D., and García-Jiménez, J. 1996. Influencia de la fecha de observación y la densidad de inóculo en la patogenicidad de *Acremonium cucurbitacearum* a melón. VIII Congreso Nac. SEF. p181(Abst)
- Armengol, J., Sanz, E., Martínez Ferrer, G., Sales, R., Bruton, B.D., and García- Jiménez, J. 1998. Host range of *Acremonium cucurbitacearum*, cause of *Acremonium* collapse of muskmelon. *Plant Pathology* 47: 29-35.
- Avgelis, A. 1985. Occurrence of Melon Necrotic Spot Virus in Crete (Greece). *Phytopathology Z* 114: 365-372.
- Barr, D.J.S. 1968. A new species of *Olpidium* parasitic on cucumber roots. *Can. J. Bot.*, 46:1087-1091
- Blancard, D.; Lecoq, H.y Pitrat, M.1991. Enfermedades de las cucurbitáceas: Observar, Identificar y Luchar. INRA. ISBN: 2-7380-0311-7. 301pp.
- Bos, L., Van Dorst, H.J.M., Huttinga, H and Maat, D.Z. 1984. Further characterization of Melon Necrotic Spot Virus causing sever disease in glasshouse cucumbers in the Netherlands and its control. *Neth. J. Pl. Path.* 90:55-69.
- Bruton, B.D., Davis, R. M. and Gordon, T.R. 1995. Occurrence of *Acremonium* sp. and *Monosporascus cannonballus* in the major cantaloupe and watermelon growing areas of California. *Plant disease* 79(7):754.
- Bruton, B.D., Miller, M.E. and García-Jiménez, J. 1996. Comparison of *Acremonium* sp. from the Lower Río Grande Valley of Texas with *Acremonium* sp. from Spain. *Phytopatology* 86: 11 S3(23A).
- Bruton, B.D. and Miller, M.E. 1997a. Occurrence of vine decline diseases of melons in Honduras. *Plant Disease* 81:696.
- Bruton, B.D. and Miller, M.E. 1997b. Occurrence of vine decline diseases of muskmelon in Guatemala. *Plant Disease* 81:694.
- Bruton, B.D. 1998. Soilborne diseases in Cucurbitaceae: pathogen virulence and host resistance. Pages 143-166. In: *Cucurbitaceae '98*. McCreight J., Ed: Amer. Society Hor. Sci. Press, Alex., Va. USA.
- Bruton, B.D., García- Jiménez, J., Armengol, J. and Popham, T.W. 2000(a). Assessment of virulence of *Acremonium cucurbitacearum* and *Monosporascus cannonballus* on *Cucumis melo*. *Plant Disease* 84: 907-913.

- Bruton, B.D., Popham, T.W., Armengol, J., García- Jiménez, J. and Miller, M.E. 2000(b). Disease reaction among selected Cucurbitaceae to an *Acremonium cucurbitacearum* isolate from Texas. HortScience 35(4):677-680.
- Camacho Ferre, F. 2003. El cultivo de sandía invernada. En Técnicas de producción en cultivos protegidos. 776 pp. Ed. Cajamar. Almería.
- Camacho Ferre, F y Fernández Rodríguez, E.J. 1997. Influencia de patrones utilizados en el cultivo de sandía bajo plástico sobre la producción, precocidad y calidad del fruto en Almería. 141 pp. Ed. Caja Rural de Almería. Almería.
- Campbell, R.N. 1962. Relationship between the lettuce big-vein virus and its vector, *Olpidium brassicae*. Nature 195:675-677.
- Campbell, R.N., Lecoq, H., Wipf-Scheibel, C. and Sim, S.T. 1991. Transmission of cucumber leaf spot virus by *Olpidium radicale*. Journal of General Virology 72:3115-3119.
- Campbell, R.N. and Sim, S.T. 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radicale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. Canadian Journal of Botany 72:1136-1143.
- Campbell, R.N., Sim, S.T and Lecoq, H. 1995. Virus transmission by host-specific strains of *Olpidium bornovanus* and *Olpidium brassicae*. European Journal of Plant Pathology 101:273-282.
- Campbell, R.N., Wipf-Scheibel, C. and Lecoq, H. 1996. Vector-Assisted transmission of Melon Necrotic Spot Virus in melon. Phytopathology 86: 1294-1298.
- Cánovas, F. 1994. Principios básicos de la hidroponía. Aspectos diferenciales de los cultivos con y sin suelo. En Cultivos sin suelo. Curso superior de especialización. Ed Canovas, F y Díaz, J.R. Almería.
- Cebolla, V. y Campos, T. 1985. El colapso del melón en el litoral valenciano. VI Congreso de la SEF. Pamplona
- Cebolla, V., Campos, T. y García, M. 1990. *Rhizoctonia solani* causante del colapso del melón en el País Valenciano. Actas de Horticultura del III Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas.
- Cohen, R., Pivonia, S., Shtienberg, D., Edelstein, M., Raz, D., Gerstl, Z and Katan, J. 1999. Efficacy of Fluazinam in suppression of *Monosporascus cannonballus*, the causal agent of sudden wilt of melons. Plant Disease 83:1137-1141.
- Coudriet, D.L., Kishaba, A.N., Bohn, G.W. 1981. Inheritance of resistance to muskmelon necrotic spot virus in a melon aphid-resistant breeding line of muskmelon. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 106: 789-791.
- Cuadrado, I. M. y Gómez, J. 1983. Observaciones sobre el estado sanitario de los cultivos hortícolas en Almería. Boletín Informativo de la E.I.C.H.I. de Almería
- Cuadrado, I. M. y Gómez, J. 1984. Protección de cultivos en invernadero. En: Horticultura Mediterránea de Invernadero. Ed. López L. Y Castillo J.E. 173-216.

- Cuadrado, I. M., Gómez, J. y Moreno, P. 1993. El virus de las manchas necróticas del melón I. Importancia del MNSV como causa de la muerte súbita del melón. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, 19:93-106.
- Dias, H.F. 1970. Transmisión of cucumber necrosis virus by *Olpidium cucurbitacearum*. Virology 40:828-839.
- Egel, D.S., Rane, K., Latin, R.X. and Martyn, R.D. 2001. Mature watermelon vine decline: a disease of unknown etiology in southwestern Indiana. Phytopathology 91: S26.
- Egel, D.S. and Adkins, S. 2007. Squash Vein Yellowing Virus identified in watermelon (*Citrullus lanatus*) in Indiana. Plant Disease 91:1056.
- Escobar I, J.J Berenguer, M García, J.Gómez y A. Alvarez. 2003. Control de *Phytophthora* spp. en cultivos sin suelo de pepino y tomate cereza. Actas de Horticultura Nº 39. X Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas, Pontevedra, Protección de Cultivos. p. 540-542.
- Fry, P.R. and Campbell, R.N. 1966. Transmission of a tobacco necrosis virus by *Olpidium brassicae*. Virology 30:517-527.
- Furuki, I. 1981. Epidemiological Studies on melon necrotic spot. Shizuoka Agr. Exp. Sta. Shizuokaken, Japan. Tech Bull, 14 94 pp.
- García-Jiménez, J., Velázquez, M.T., Alfaro, A. 1989a. Secuencia de síntomas en el colapso del melón. Bol.San. Veg. Plagas.4:333-342.
- García- Jiménez, J., Velázquez, M.T., Alfaro, A. 1989b. *Acremonium* sp. agente causal del colapso del melón en el Levante español. V Congreso de la SEF: 17-18.
- García- Jiménez, J., Martínez Ferrer, G., Armengol, J., Velázquez, M.T., Orts, M., Juárez, M., Ortega, A., Jordá, C. y Alfaro, A. 1993. Agentes asociados al “colapso del melón” en distintas zonas españolas. Bol.San. Veg. Plagas 19: 401-423.
- García- Jiménez, J., Velázquez, M.T., Jordá, C. y Alfaro, A. 1994. *Acremonium* species as the causal agent of muskmelon collapse in Spain. Plant disease 78(4):416-419.
- Gómez, J., Cuadrado, I.M. y Juan, E. 1988. Muerte súbita del melón. Poniente 152:22-23.
- Gómez, J. 1989. Enfermedades causadas por hongos de suelo en melón y pepino. Cuadernos de Fitopatología nº20:106-108.
- Gómez, J. 1990. Presencia de *Olpidium brassicae* y *Olpidium radicale* (*Phycomycetes*, *Chytridiales*), en Almería. Actas III Congreso Nacional de la SECH: 400-406.
- Gómez, J. 1993. Enfermedades del melón en los cultivos “sin suelo” de la provincia de Almería. Comunicación I+D Agroalimentaria 3/93. Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. 64 pp.
- Gómez, J. 1994. Enfermedades causadas por hongos de suelo de los cultivos hortícolas bajo plástico de Almería. En Sanidad vegetal en la horticultura protegida. Cursos superiores 1/94. Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. 441 pp.
- Gómez, J. 2004. Enfermedades causadas por hongos de suelo en los cultivos hortícolas del sudeste de Andalucía. En La protección sanitaria en la

- Agricultura ecológica 474 pp. Curso superior de especialización. Ed. Cuadrado Gómez, I.M. y García García, M.C.
- Gómez, J. y Velasco, V. 1991. Presencia de *Olpidium radicale* en los embalses para riego en Almería. *Phytoma* 33:23-27.
- Gómez, J., Cuadrado, I. M., y Velasco, V. 1993a. El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería.II. Eficacia de la desinfección del suelo frente al MNSV. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 19:179-186.
- Gómez, J., Cuadrado, I. M., y Velasco, V. 1993b. El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería.III. Eficacia del injerto del melón para combatir el MNSV. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 19:187-192.
- González-Garza, R., Gumpf, D.J., Kishaba, A.N. y Bohn, G.W. 1979. Identification seed transmission and host range pathogenicity of a California isolate of Melon Necrotic Spot Virus. *Phytopathology* 69:340-345.
- Gubler, W.D. 1996. *Pythium* and *Phytophthora* damping-off and root rot. En *Compendium of cucurbits diseases*. 87 pp. Ed. Thomas A. Zitter, Donald L. Hopkins and Claude E. Thomas.
- Gubler, W.D. 2004. Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi Prensa 9-10. ISBN 84-8476-161-4.
- Guirado, M.L., Rodríguez, J.M., Serrano, Y., Sáez, E. Y Gómez, J. 2006(a). Eficacia de la desinfección del sustrato contra *Olpidium bornovanus* y MNSV en cucurbitáceas. *Vida rural*, ISSN 1133-8938, Nº 236, págs. 50-55
- Guirado, M.L., Rodríguez, J.M., Serrano, Y., Sáez, E. Y Gómez, J. 2006(b). Control de *Olpidium bornovanus* mediante el mojante Agral en cultivos sin suelo. VIII International Symposium on Protected Cultivation in Mild Wintwr Climates Advances in Soil ans Soilless Cultivation Under Protected Environment February 19-24 Agadir, Morocco.
- Guirado, M.L., Sáez, E., Serrano, Y., Gómez, J. 2009a. Etiología de la muerte súbita de la sandía en invernaderos del sureste peninsular de España. *Bol. San. Veg. Plagas*, 35:617-628.
- Guirado, M.L., Sáez, E., Serrano, Y., Gómez, J. 2009b. Obtención y caracterización de aislados monoesporangiales de *Olpidium bornovanus*. *Bol. San. Veg. Plagas*, 35:629-644.
- Gwynne, B.J., Davis, R.M. and Gordon, T.R. 1997. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon vine decline in California. *Phytopathology* 87:S37.
- Herrera-Vásquez, J.A., M.C. Córdoba-Sellés, M.C. Cebrián, A. Alfaro-Fernández and C. Jordá. 2009. Seed transmission of Melon necrotic spot virus and efficacy of seed-desinfection treatments. *Plant Pathology* 58:436-442.
- Hibi, T. and Furuki, I. 1985. Melon Necrotic Spot Virus. AAB. Descriptions of Plant Viruses N 302.
- Hiruki, C. 1965. Transmission of tobacco stunt virus by *Olpidium brassicae*. *Virology* 25:541-549.
- Juárez M., Gómez, M., Ortega, A., Armengol, J., Fortí, J., Martínez Ferrer, G., García- Jiménez, J., Jordá Gutiérrez C. 1993. Un virus en expansión: el cribado del melón. *Phytoma España* (45) 13-17

- Karlatti, R.S., Abdeen, F.M. and Al-Fehaid, M.S. 1997. First report of *Monosporascus cannonballus* of melons in Saudi Arabia. Plant Disease 81:1215.
- Kim, D.H., Rasmussen, S.L. and Stangellini, M.E. 1995. *Monosporascus cannonballus* root rot of muskmelon: Root infection and symptom development in relation to soil temperature. (Abstr.). Phytopathology 85:1195.
- Kishi, K. 1966. Necrotic spot on melon, a new virus disease. Ann. Phytop. Soc. JPN. 32:138-144.
- Lange, L. and Insuza, V. 1977. Root-inhabiting *Olpidium* species: the *Olpidium radicale* complex. Trans. Br. Mycol. Soc.69(3) 377-384.
- Lin, M.T., Campbell, R.N., Smith, P.R. and Temmik, J.H.M. 1970. Lettuce big-vein virus transmission by single-sporangium isolates of *Olpidium brassicae*. Phytopathology 60:1630-1634.
- Lobo Ruano, M. 1990(b). Colapso del melón producido por hongos del género *Monosporascus*. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 16:701-707.
- Lobo Ruano, M. 1991. Las graves alteraciones de melonares y sandiares. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 17:133-163.
- Lovisoló, O. 1980. Virus and viroid diseases of cucurbits. Act. Horticulturae 88:33-71.
- Luis, M. 1986. Virosis de las cucurbitáceas. I Jornadas Nacionales de cultivos protegidos. Almería. 20pp.
- Luis, M. 1991. Virosis de las cucurbitáceas en España. Phytoma España nº 25: 9-16.
- Maccarone, L.D., Barbetti, M.J., Sivasithamparam, K. and Jones, R.A.C. 2010. Molecular Genetic Characterization of *Olpidium virulentus* Isolates Associated with Big-Vein Diseased Lettuce Plants. Plant Disease 94: 563-569.
- MARM, 2010. Anuario de estadística del Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino 2010.
- Maroto, J.V. 2000. Elementos de horticultura general. 424 pp. Ed. Mundiprensa
- Maroto, J.V., Miguel Gómez, A. y Pomares García, F. 2002. El cultivo de la sandía. 322pp. ISBN-8484760715. Ed Mundiprensa
- Martyn, R.D. 1996. Fusarium wilt of watermelon. En Compendium of cucurbits diseases. 87 pp. Ed.Thomas A. Zitter, Donald L. Hopkins and Claude E. Thomas.
- Martyn, R.D., Lovic, B.R., Maddox, D.A., Germash, A. and Miller, M.E. 1994. First report of *Monosporascus* root rot / vine decline of watermelon in Tunisia. Plant disease 78:1220.
- Martyn, R.D., Miller, M.E., Lovic, B.R., Park, Y.J. and Batten, J.S. 1995. *Monosporascus* root rot/vine decline: an emerging disease of melons. Phytopathology, 85:12-1563.
- Martyn, R.D., Batten, J.S., Park, Y.-J. and Miller, M.E. 1996. First report of *Monosporascus* root rot/vine decline of watermelon in Mexico. Plant disease 80:1430.
- Martyn, R.D. and Miller, M.E. 1996. *Monosporascus* root rot and vine decline. An emerging disease of melons worldwide. Plant Disease 80: 716-725.

- Mertely, J.C., Martyn, R.D., Miller, M.E. and Bruton, B.D. 1991. Role of *Monosporascus cannonballus* and other fungi in a roor rot/vine decline disease of muskmelon. *Plant disease* 75:1133-1137.
- Mertely, J.C., Martyn, R.D., Miller, M.E. and Bruton, B.D. 1993. An expanded host range for the muskmelon pathogen *Monosporascus cannonballus*. *Plant disease* 77:667-673.
- Messiaen, C.M., Blancard, D., Rouxel, F. y Lafon, R. 1995. Enfermedades de las hortalizas. 576 pp. Ed. Mundi-Prensa.
- Miguel Gómez, A y Maroto Borrego, J.V. 2000. Nuevas técnicas en el cultivo de la sandía. Ed.Fundación Caja Rural Valencia. Valencia.
- Miguel, A., Armengol, J., Martínez Ferrer, G., García Morato, M., Velázquez, M.T., Roselló, J. y García Jiménez, J. 1993. Estudios sobre el control del colapso del melón asociado a *Acremonium* sp mediante la utilización de portainjertos. *Actas de Horticultura*, 2, 1465-71.
- Pivonia, S., Cohen, R., Kafkafi, U., Ben Ze'ev, I.S. and Katan, J. 1997. Suden wilt of melons in southern Israel: Fungal agents and relationship with plant development. *Plant Disease* 81: 1264-1268.
- Pollack, F.G., Uecker, F.A. 1974. *Mosporascus cannonballus* an unusual ascomycete in cantaloupe roots. *Mycologia*.Vol 66,1974.
- Requena García, J.I. 1999. Cultivo hidropónico de la sandía (*Citrullus lanatus*). En *Cultivos sin suelo II. Curso superior de especialización*. 590 pp. Ed. Fernández Fernández, M y Cuadrado Gómez, I.M.
- Reuveni, R. and Krikun, J. 1983. Occurrence of *Monosporascus eutypoides* under arid conditions of Israel. *Trans. Br. Mycological Society* 80(2).
- Reuveni, R., Krikun, J. And Shani, U. 1983. The role of *Monosporascus eutypoides* in a collapse of melons plants in a arid area of Israel. *Phytopatology* 73:1223-1226.
- Sales, R., Bezerra do Nascimento, I.J., Souza Freitas, L., Beltrán, R. Armengol, y García-Jiménez, J. 2004. First report of *Monosporascus cannonballus* on melon in Brazil. *Plant Disease* 88:84.
- Schwartz, E.J., and Cook, W.R.I. 1928. The life-history and citology of a new species of *Olpidium*; *Olpidium radicale* sp. Nov. *Transactions British Mycological Society* 13:205-220.
- Serrano Cermeño, Z. 1996. Veinte cultivos de hortalizas en invernadero. *Cultivo de sandía*. 637pp. ISBN- 84-605-4596-2.
- Serrano Y, Guirado ML, Carmona MP, Gómez J, Melero-Vara JM. 2008. First report of root and crown necrosis of bean caused by *Pythium aphanidermatum* in Spain. *Plant disease* 92:174.
- Smith, I.M; Dunez, J.; Lelliott, R.A.; Phillips, D.H.; Archer, S.A.1992. *Manual de enfermedades de las plantas*. Ed Mundi Prensa. 671pp.
- Stanghellini, ME, Mathews, D.M.and Misaghi, I.J. 2009. *Olpidium bornovanus*: A root pathogen?. *Phytopathology*, 99: S123
- Stanghellini, ME, Mathews, D.M.and Misaghi, I.J. 2010. Pathogenicity and management of *Olpidium bornovanus*, a root pathogen of melon. *Plant Disease*, 94:163-166.

- Teakle, D.S. and Thomas, B.J. 1985. Effect of heat motility and multiplication of *Olpidium radiale* and *O. brassicae*. Ann. Appl. Biol. 107:, 11-15.
- Tello, J.C. y García, M. 1977. Prospección de enfermedades micológicas en plantas hortícolas (tomate, pimiento, melón, judía y sandía). Publicación 7º División Regional Agraria. Ministerio de Agricultura, 28 pp.
- Tello, J.C., Gómez J, Camporota, P. y Lacasa, A. 1990. Capacidades parasitarias de *Pythium aphanidermatum* spp. y de *Rhizoctonia solani* (Köhm) sobre pepino y melón. Bol. San. Veg. Plagas 16:733-741.
- Tomlinson, J.A. and Faithfull, E. 1979. Effects of fungicides and surfactants on the zoospores of *Olpidium brassicae*. Ann. App. Biol. 93: 13-19.
- Tomlinson, J.A. and Thomas, B.J. 1986. Studies on melon necrotic spot virus disease of cucumber and on the control of the fungus vector (*Olpidium radiale*). Ann. Appl. Biol. 108: 71-80.
- Troutman, J.L. and Matejka, J.C. 1970. Three fungi associated with cantaloupe roots in Arizonz. (Abstr.) Phytopathology 60:1317.
- Urrestarazu, M. 2004. Bases y sistemas de cultivos sin suelo. En Tratado de cultivos sin suelo. 914 pp. Ed. Mundiprensa.
- Wolf, D.W. and Miller, M.E. 1997. Tolerance to *Monosporascus* root rot and vine decline in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm. HortScience 33(2):287-290.
- Zinnen, T.M. 1988. Assessment of plant diseases in hydroponic culture. Plant Disease 72:96-99.

Ref 1- <http://www.extension.purdue.edu/extmedia/BP/BP-65-W.pdf>

Ref 2- <http://www.ces.purdue.edu/extmedia/BP/BP-44.html>

Ref3- www.nationalwatermelonassociation.com/docs/VineDecline.doc and http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=182627