



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL.

DIAGNÓSTICO FITOPATOLÓGICO
EN PLANTULAS DE MELÓN
PROCEDENTES DE SEMILLERO.

PROYECTO FIN DE CARRERA
INGENIERÍA TÉCNICA AGRÍCOLA
Esp. Industrias Agrarias y Alimentarias.
Alumno: MARIA ISABEL MARTOS ALAMEDA.

Director:
MILAGROSA SANTOS HERNÁNDEZ

FERNANDO DIANEZ MARTÍNEZ

Julio, 2011

INDICE

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA HORTICULTURA INTENSIVA.....	7
1.1. Horticultura en Almería.....	9
1.1.1. Producción de melón en Almería.....	9
2. SEMILLEROS: BASE DE LA HORTICULTURA ALMERIENSE.....	10
2.1. Problemática de los semilleros.....	10
2.1.1. Enfermedades de las plántulas en los semilleros.....	11
3. OBJETIVOS DE ESTE ENSAYO.....	11

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN DE SEMILLERO HORTÍCOLA.....	12
2. LEGISLACIÓN PARA SEMILLEROS.....	13
2.1. Semillas.....	13
2.2. Substratos	13
2.3. Semilleros.....	13
3. INSTALACIONES.....	16
3.1. Invernaderos	16
3.2. Maquinaria de siembra.....	18
3.3. Cámara de germinación	20
3.4. Cámara de cultivo.....	20
3.5. Taller de injertos.....	21
3.5.1. Injertos.....	21
3.5.1.1. Tipos de injertos.....	21
3.6. Banquetas de cultivo.....	22
3.7. Sistemas de riego.....	23
3.8. Sistemas de tratamientos fitosanitarios.....	23
3.9. Climatización.....	24
4. MATERIALES.....	26
4.1. Substratos.....	26
4.2. Bandejas y fundas.....	27
4.3. Otros materiales.....	27
5. CULTIVOS.....	28

6.	LABORES DE CULTIVO.....	30
6.1.	Riego.....	30
6.2.	Tratamientos fitosanitarios.....	30
6.2.1.	Campaña de Primavera-Verano.....	31
6.2.2.	Campaña de Otoño-Invierno.....	31
7.	PROCESO DE PRODUCCIÓN.....	32
8.	VENTAJAS QUE PROPORCIONAN LOS SEMILLEROS.....	34
8.1.	Normas generales para una buena germinación.....	34
8.2.	Tiempo en semillero.....	35
9.	DESARROLLO DE PLÁNTULAS.....	36
9.1.	Acondicionamiento y control.....	36
10.	ENFERMEDADES DE LOS SEMILLEROS.....	37

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

1.	EMPLAZAMIENTO DEL ENSAYO.....	39
1.1.	Ubicación del semillero.....	39
1.2.	Características del semillero.....	39
1.2.1.	Exportación e importación.....	40
1.2.2.	Sistema de riego.....	40
1.2.3.	Siembra.....	41
1.2.4.	Tipos de sustratos.....	41
1.2.5.	Clima.....	42
2.	MATERIAL VEGETAL.....	43
3.	MÉTODO EXPERIMENTAL.....	44
3.1.	Análisis de plántulas y semillas.....	44
3.1.1.	Análisis de plántulas.....	44
3.1.1.1.	Selección del material vegetal.....	44
3.1.1.2.	Estudio de las plántulas.....	44
3.1.1.3.	Análisis de los daños.....	46
3.1.2.	Análisis de semillas.....	47
4.	IDENTIFICACIÓN DE RESULTADOS EN PLACA.....	49
4.1.	Identificación de hongos.....	49

4.2. Identificación de bacterias.....	49
5. EXTRACCIÓN DEL ADN SIGUIENDO EL PROTOCOLO E.Z.N.A.....	50
5.1. Los indicadores.....	51
5.2. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR.....	52
5.3. Electroforesis de los productos de la PCR.....	58
6. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR.....	62
7. MEDIOS DE CULTIVO.....	63
7.1. Medio Caldo Nutritivo (CN).....	63
7.2. Medio Agar-Patata-Dextrosa (PDA).....	63
7.3. Medio TSA.....	64
8. ANÁLISIS MOLECULAR.....	64
8.1. Ordenación del ADN de las muestras estudiadas.....	64
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	
1. IDENTIFICACIÓN DE RESULTADOS.....	65
1.1. Método de análisis para los resultados obtenidos en el análisis de las plántulas.....	66
1.2. Resultados obtenidos en placas.....	66
1.2.1. Muestreos en placas.....	66
1.2.2. Muestreo en semillas.....	75
2. LA ELECTROFORESIS, RESULTADOS DE LA PCR.....	76
3. ANÁLISIS MOLECULAR.....	77
3.1. Análisis molecular para la muestra 5.....	77
3.1.1. Análisis molecular de la muestra 5 (cadena complementaria)....	78
3.2. Análisis molecular para la muestra 6.....	79
3.2.1. Análisis molecular para la muestra 6 de su cadena complementaria 6-pH.....	80
3.3. Análisis molecular de la muestra 7.....	81
3.3.1. Muestra 7, cadena complementaria de ADN, 7-pH.....	82
3.4. Análisis de la muestra 10.....	83
4. DISCUSIONES.....	84
V. CONCLUSIONES.....	86
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	87

INDICE DE CUADROS.

CUADRO 1: <i>Temperaturas óptimas de las especies más cultivadas FUENTE: Camacho, 2003</i>	28
CUADRO 2: <i>Periodos de tiempo necesarios para las especies más cultivadas. Fuente: Camacho, 2003</i>	28
CUADRO 3: <i>Características de las especies más cultivadas. Fuente: Camacho, 2003</i>	29
CUADRO 4: <i>Posibles fechas de siembra para melón y tiempo en semillero</i>	35
CUADRO 5: <i>Reactivos para la reacción de PCR</i>	56
CUADRO 6: <i>Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de los distintos tamaños de fragmentos de ADN</i>	58
CUADRO 7: <i>Resultados registrados en las placas procedentes del análisis de plántulas de melón</i>	74
CUADRO 8: <i>resultados registrados en Placa Petri procedentes del análisis de semillas</i>	75
CUADRO 9: <i>Posibles bacterias resultado de la muestra número 5</i>	77
CUADRO 10: <i>Resultados para la muestra número 5, correspondientes a la cadena de ADN complementaria</i>	78
CUADRO 11: <i>Resultados de la cadena de ADN correspondiente a la muestra 6</i>	79
CUADRO 12: <i>Resultados de la cadena complementaria 6-pH, correspondiente a la muestra 6</i>	80
CUADRO 13: <i>Resultados obtenidos para la muestra número 7</i>	81
CUADRO 14: <i>Resultados obtenidos de la muestra 7, con su cadena de ADN complementaria</i>	82
CUADRO 15: <i>Resultados obtenidos para la muestra 10</i>	83

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. <i>Campos de invernaderos en Almería. Fuente: www.dw-world.de</i>	8
FIGURA 2: <i>Detalle colocación de bandejas en semillero</i>	17
FIGURA 3: <i>Detalle estructura tipo multitúnel en semillero Fuente: Invernaderos el pilar</i>	18
FIGURA 4: <i>Detalle de banqueta de cultivo. Fuente: Horticom</i>	22
FIGURA 5: <i>Localización de El Plantel semilleros</i>	39
FIGURA 6: <i>Tren de riego automático, Semillero el Plantel</i>	40
FIGURAS 7: <i>Equipos de siembra</i>	41
FIGURA 8: <i>Sustratos utilizados por El Plantel Semilleros</i>	41
FIGURA 9: <i>Fruto de melón cv. Ricura .Fuente: http://www.ruralcaja.org/download/portainj_melon.pdf</i>	43
FIGURAS 10: <i>Selección de las plántulas muestreadas</i>	45
FIGURAS 11: <i>Estudio y anotación de los daños en las plántulas</i>	46
FIGURA 12: <i>Distribución de semillas enplacas</i>	47
FIGURA 13: <i>Semillas de melón Ricura, pasadas 48 horas a temperatura ambiente</i> ...48	
FIGURA 14: <i>Pasos básicos de la PCR (de Andy Vierstracte 1999)</i>	54
FIGURA 15: <i>Amplificación exponencial del PCR</i>	55
FIGURA 16: <i>Termociclador usado en el presente PFC</i>	57
FIGURA 17: <i>Termociclador donde podemos observar las diferentes partes para su programación y posterior funcionamiento</i>	57
FIGURA 18: <i>Placas de metacrilato, con el peine para hacer los pocillos</i>	59
FIGURA 19: <i>Gel de agarosa líquido, al disminuir la temperatura solidificará</i>	60
FIGURA 20. <i>Carga del gel de agarosa, y detalle de la carga</i>	60

FIGURA 21. *Fuente de alimentación conectada al gel*.....61

FIGURA 22. *Lámpara de luz ultravioleta para la visualización de geles*.....61

FIGURA 23: *Resultado de las placas con las muestras de plántulas, pasado 24 horas en estufa*.....65

FIGURA 24: *Resultados obtenidos de la tinción del gel, visto en la lámpara ultravioleta*.....76

FIGURA 25: *Esquema general de ordenación de las bacterias según sus 100 pares de bases*.....84

FIGURA 26: *Detalle del esquema general de clasificación bacteriana*.....85

I. INTERÉS Y OBJETIVOS.

1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA HORTICULTURA INTENSIVA.

El sector hortofrutícola tiene un papel muy importante tanto dentro de la agricultura como en el conjunto de la economía española. Su participación en la producción final agraria alcanza el 37%, cifra altamente significativa y que ha aumentado en los últimos años desde un 32% en 2000 hasta el 37% de 2006, último año con datos disponibles. (MARM, 2011).

El sector hortícola constituye un sector estratégico para la economía nacional y andaluza. Por su aportación a la producción de la rama agraria, a la vez que por su clara vocación exportadora, juega un papel fundamental en el equilibrio de nuestra balanza comercial. Representa junto con el sector de los productos hortícolas al aire libre más del 25% de la producción de la rama agraria andaluza y más del 30% de la producción vegetal.

Por otra parte, la actividad hortícola es la principal fuente de ingresos de un gran número de familias andaluzas, integrando el motor económico y social de determinadas comarcas de nuestra geografía. (Junta de Andalucía, 2011)

La gran incidencia que tiene la agricultura sobre el conjunto de la economía de Almería, es un hecho diferencial de la provincia, hasta el punto que, durante años, la evolución de la renta y el empleo provincial ha estado determinada por la marcha de la campaña hortícola. Hablar de agricultura en Almería es hablar de la producción hortícola en cultivos intensivos (invernaderos) ya que, la producción final agraria la aporta este subgrupo de productos.

En Almería, el sector primario ha sido el que ha conseguido sacar a la provincia de una prolongada situación de pobreza en las últimas cuatro décadas. De este modo es posible hablar del “modelo Almería”, modelo que es objeto de estudio de muchas universidades e instituciones con el fin de tratar de exportar este modelo a otras zonas del mundo, que se encuentran en situación similar a como se encontraba la provincia de almeriense hace años. Este modelo representa el máximo exponente en agricultura intensiva bajo plástico en España a nivel tecnológico y se ha desarrollado principalmente durante los últimos treinta años.



FIGURA 1. Campos de invernaderos en Almería .FUENTE: www.dw-world.de

Fernández Lavandera y Pizarro Checa (1981) plasmaron la sorpresa y admiración de observar como una provincia española en la periferia de la periferia, desertizada y erosionada en buena parte de su territorio, con carencias muy graves en sus infraestructuras, carente casi por completo de industria, sin burguesía autónoma de cierta entidad ha pasado de ser la última provincia en renta per cápita en el año 1969, a ocupar posiciones intermedias en el “ranking” español, aumentando su aportación al PIB nacional en casi un 50 % entre 1955 y 2002; con el siguiente párrafo:

“La segunda mitad de nuestro siglo nos tiene acostumbrados a los milagros (...) Pero surge ahora el caso de Almería y, contra las leyes económicas y sociales, resulta que se ha conseguido un gran desarrollo, precisamente gracias a la agricultura; hecho tan singular que no cabe calificarlo más que así: el milagro del milagro”.

Uno de los índices que se emplea, para conocer la evolución económica de una zona es analizar la evolución de su población, y la provincia durante una parte del siglo XX ha sufrido una gran depresión económica la cual se refleja en la evolución de su población. Mientras que en el conjunto de España y Andalucía la población crece ininterrumpidamente, Almería permaneció estancada incluso en retroceso. Consecuencia de lo anterior es que cuando el conjunto de España dobla su número de habitantes, en la provincia solo aumenta un 46% la población. Este fenómeno se dio hasta la década de los ochenta, a partir de la cual habido un aumento en la población del 33%, cita que dobla el 17% que ha crecido Andalucía y muy superior al crecimiento en España que ha crecido tan solo un 11%.(Camacho Ferre, F., 2003). En los últimos 20 años es donde se produce un crecimiento más acusado de la población en la provincia, debido al gran número de inmigrantes que han llegado atraídos por la demanda del mercado laboral del sector agrario.

El modelo se caracteriza por ser muy intensivo tanto en capital como en mano de obra, lo cual demanda un substancial desembolso de dinero para conservar las explotaciones. La mano de obra en general supone la mayor parte de los gastos, ya que se requiere de muchos trabajadores durante el ciclo de cultivo. Es por ello que la agricultura intensiva del litoral almeriense destaca en el conjunto autonómico y nacional por su fuerte demanda de trabajo (Zarilli, A.; 2003).

Desde el punto de vista económico si observamos la evolución de la renta per cápita en Almería desde 1967, según los datos del servicio de estudios del BBVA, y los comparamos con los del conjunto de España, se pueden apreciar tres etapas; en los años setenta se produce un gran despegue de la economía almeriense, manteniendo tasas de crecimiento superiores a la española y por tanto, aproximándose de manera considerable a la renta media, alcanzando al final de la década un 88% de la media nacional; en los años ochenta y hasta la crisis del 93, Almería crece en términos de renta per cápita a un nivel muy similar al conjunto de España manteniéndose el diferencial respecto a los valores medios. Desde 1993, año que coincide con la creación del Mercado único Europeo, Almería vuelve a crecer a un ritmo superior a la media española hasta colocarse por encima del 90% de la renta familiar en España.

En la actualidad son muchos los factores que afectan al sector hortícola almeriense, los acuerdos de la Organización Mundial del Comercio tendentes a la liberación de los mercados, inciden cada vez más en la competitividad de un sector que nunca se ha contado entre los más protegidos dentro de la Unión Europea. Así mismo, el continuo aumento de los precios de los insumos agrícolas, provoca una reducción paulatina de los márgenes de producción.

Se trata entonces de un sector con una alta capacidad de generar empleo y cuya importancia trasciende al sector agrario, siendo el motor del desarrollo de la provincia junto con el turismo y llevando consigo un gran desarrollo de la industria auxiliar.

1.1. Horticultura en Almería.

Almería, es la principal provincia de Andalucía en producción hortofrutícola, la cual registró el pasado 2010 una producción total de 4888959 toneladas.

La producción hortícola obtenida en Almería se desarrolla mayoritariamente en cultivo bajo abrigo, (Tello, 2003), proporcionando así las características óptimas en producción y en calidad.

1.1.1. Producción de melón en Almería.

Al centrarnos en la producción de melón Almería logró establecer en la campaña 2010 una superficie de 4030 hectáreas, entre campo abierto e invernaderos, con una producción total de 141964 toneladas. (CONSEJERIA DE AGRICULTURA Y PESCA, JUNTA DE ANDALUCIA, 2011).

Y a nivel nacional se registran datos de tal índole; España, según la FAO (2003) fue el 5º productor de melones en el mundo, después de China, Turquía, Estados Unidos e Irán, situándose por encima de Rumania, Egipto, India, México e Italia; en exportaciones su puesto fue el 3º, después de Brasil y Guatemala.

2. SEMILLEROS: BASE DE LA HORTICULTURA ALMERIENSE.

El empleo de semillas y plantas de vivero es un factor básico para la actividad agraria, por constituir una de las inversiones con efecto multiplicador más elevado, por su significativa y positiva incidencia en la capacidad productiva, resistencia a agentes adversos y calidad de las cosechas. Mediante las semillas y plantas de vivero se logra, además, una transferencia plena de tecnología de vanguardia desde el laboratorio de investigación al campo de cultivo.

Se entiende por plantas de vivero las plantas enteras y partes de plantas destinadas al establecimiento de plantaciones, así como los materiales vegetales no incluidos en la definición de semillas y que se utilicen para la reproducción o multiplicación, incluidos los clones. (Ley 30/2006, de 26 de julio, de semillas y plantas de vivero y de recursos fitogenéticos).

El origen en su totalidad de las plantas que se siembran en las explotaciones protegidas, proceden en su gran mayoría de semilleros, en los cuales se lleva a cabo la siembra y germinación de las semillas así como el cuidado de las plántulas desde su primer estadio hasta que alcanzan el desarrollo propicio para el trasplante. (Camacho, *et al.* 2003).

Los semilleros hortícolas de España y especialmente en Almería se han hecho imprescindibles en la cadena de producción de la horticultura intensiva, realizando una doble función: (Guzmán, 2002)

- Germinación de semillas
- Obtención de plántulas de calidad

2.1. Problemática de los semilleros.

Uno de los aspectos que se debe tener en cuenta, es que cuando las plántulas se encuentran en fase de germinación, emergencia y desarrollo inicial son muy susceptibles a la infección por los patógenos; esto es debido a los exudados liberados durante la germinación de las semillas proveen al patógeno edáfico de una base nutritiva que facilita la patogénesis y a que los tejidos jóvenes tienen una escasa resistencia constitutiva a las enfermedades. (Avilés, *et al.* 2002).

Estas enfermedades como se ha citado anteriormente afectan a las semillas antes de germinar, durante la germinación y después de la emergencia hasta que aparece la primera o segunda hoja verdadera (Camacho, *et al.* 2003), este estado también es reconocido por el nombre de "*damping-off*" dando lugar a plantas de escaso desarrollo y nulo valor comercial (Avilés, *et al.* 2002)

Dependiendo del tipo de semilla que tratemos se tendrán que tomar consideraciones específicas para cada una de ellas ya que pueden resultar perjudiciales para el proceso productivo.

Tenemos que tener presente que la enfermedad no solo se manifiesta durante la fase de emergencia, sino que en numerosas ocasiones sus síntomas aparecen una vez que la plántula ha sido trasplantada al invernadero. (Gómez, 1993)

2.1.1. Enfermedades de las plántulas en los semilleros.

Las enfermedades más relevantes que nos podemos encontrar en un semillero pueden ser transmitidas a través de las semillas, como es el caso de algunos virus, virus del mosaico de la calabaza (SqMV), causando daños en semilleros de plántulas de calabaza para su posterior injerto en melón y sandía (Avilés, *et al* 2002) o el mosaico del tomate, TMV portados por las simientes y cuya manifestación sintomatología ocurre en pleno cultivo (Camacho, *et al* 2003).

Además las plántulas pueden verse afectadas por la acción de bacterias fitopatógenas, así como las infecciones ocasionadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en tomate y *P. syringae* pv. *Lanchrymans* en semilleros de melón.

Aunque también pueden ocasionarse estas enfermedades por los hongos presentes en el suelo entre los que se pueden destacar *Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani*.

3. OBJETIVOS DE ESTE ENSAYO.

El estudio de sanidad de un semillero está centrado en la investigación de cuál ha sido la causa agente que ha provocado la depreciación del cultivo así como la disminución en su calidad, por tanto el presente trabajo tiene por objetivo diagnosticar los problemas patológicos detectados en un semillero almeriense sobre plántulas de melón.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN DE SEMILLERO HORTÍCOLA.

Tradicionalmente se ha entendido como una parcela de cultivo con la suficiente protección para llevar a cabo la germinación de las semillas y el cuidado de las plántulas en su primer estadio de desarrollo, hasta el momento del trasplante.

Actualmente los semilleros profesionales son empresas de servicios destinadas exclusivamente a la producción de plantas, transformando las semillas en plántulas con las debidas garantías vegetativas y fitosanitarias, ofreciendo un asesoramiento técnico en la elección de variedades, fechas óptimas de trasplante, seguimiento post-trasplante y recomendaciones de cultivo idóneas.

El constante avance de la horticultura mediterránea de los últimos treinta años ha llevado consigo el desarrollo de los sectores auxiliares (riego, invernaderos, plásticos, semillas, fertilizantes, etc.), convirtiéndola en una horticultura totalmente intensiva. Paralelamente se han desarrollado los semilleros hortícolas.

En la década de los años 70 los agricultores se producían sus propias plantas por el sistema tradicional de almaciga, realizando trasplantes a raíz desnuda, es más existía un comercio de plántulas entre los propios agricultores.

Posteriormente, a principios de los años 80, apareció el primer semillero profesional andaluz en la población de El Ejido, obteniendo gran auge durante los siguientes años, con producción de plantas en bloques de turba cultivados directamente sobre el suelo, pasando por la producción de plantas sobre contenedores multiloculares, principalmente sobre bandejas de distintos materiales y tamaños colocadas en mesas aisladas del suelo.

Este continuo avance y la especialización empresarial del sector semilleros, ha hecho posible la incorporación de nuevas tecnologías de producción y manejo, tales como: mejora de las estructuras, programadores de riego y clima, robots de riego y tratamientos fitosanitarios, robots de transporte interior, cámaras de germinación, etc. Así como el desarrollo de novedosas técnicas de cultivo, destacando los injertos en sus diferentes formas (aproximación, cuña lateral, púa, etc) sobre cultivos de sandía, melón y tomate.

Los semilleros hortícolas en su doble faceta de germinadores de semillas y productores de plántulas de calidad, son un eslabón esencial de la cadena productiva de cultivos intensivos, siendo esta trascendencia aún mayor en la horticultura de Almería debido a la magnitud de sus cifras productivas (Gázquez, 1996), reflejando el desarrollo paralelo de semilleros y cultivos protegidos.

2. LEGISLACIÓN PARA SEMILLEROS.

Independientemente de la legislación que regula la actividad del sector, se hará referencia a la legislación que existe para los sectores de materias primas o productos.

2.1. Semillas.

Las semillas hortícolas clasificadas como semillas de categoría “Standard” están reguladas por:

- Directiva 70/458/CEE del Consejo de 29 de septiembre de 1970, relativa a la comercialización de semillas hortícolas.
- Orden de 1 de julio de 1985 MAPA, por la que se aprueba el Reglamento técnico de Control y Certificación de semillas de Plantas Hortícolas
- Directiva 90/654/CEE del Consejo, (Diario oficial de las Comunidades Europeas nº L353 del 17-12-1990) que modifica la anterior Directiva 70/458/CEE, relativa a la Comercialización de semillas hortícolas de septiembre de 1970, relativa a la Comercialización de semillas hortícolas.

Dicha Directiva no especifica que se realicen controles sobre la calidad fitosanitaria de la semilla (virus, hongos o bacterias), siendo las propias productoras y/o comercializadoras las que garantizan una calidad “estándar” en términos de germinación y pureza, así como los tratamientos realizados de desinfección.

2.2. Substratos

La mayoría de los materiales utilizados como substratos para la germinación y desarrollo de las plántulas son turbas de importación, perlita, vermiculita, fibra de coco o bloques de lana de roca, sobre los cuales no existe un control de calidad y fitosanitario, y una legislación específica que regule dicho sector.

La normativa existente al respecto es muy escasa y poco clara:

- Normativa sobre Turbas y Substratos MAPA, 1987 (BOE nº 146 de 19-07-91)
- Real Decreto 2071/93, MAPA (BOE nº 300 de 16-12-93)

Los productos como: turbas, perlita, vermiculita, etc., se encuentran registrados por el MAPA en el Registro de Productos Fertilizantes y Afines.

2.3. Semilleros

Los semilleros hortícolas están regulados por una extensa y complicada normativa compuesta por: Directivas de la CEE, Reales Decretos y Órdenes del MAPA y Resoluciones de las distintas Consejerías Autónomas.

La legislación existente con sus normas más significativas es:

- Orden de 9 de Marzo de 1992 (BOE nº 66 del 17-03-92), por la que se establecen las bases fitosanitarias para la producción de plantales de hortalizas y material de reproducción de ornamentales.
- Resolución de 11 de Mayo de 1992, de la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la J. A. (BOJA nº 46 del 28-05-92), por la que se establecen

normas fitosanitarias para la producción de plantales de hortalizas y material de reproducción de ornamentales.

- Directiva 92/33/CEE del Consejo, de 28 de Abril de 1992 (D.O.C.E. nº L157 del 10-06-92), relativa a la comercialización de plantones de hortalizas y de materiales de multiplicación de hortalizas, distintos de las semillas.
- Orden de 17 de Mayo de 1993 MAPA, por la que se establecen las obligaciones y normas en relación con el Registro Oficial de Productores, Comerciantes e Importadores de vegetales, así como la normalización de los Pasaportes Fitosanitarios para la circulación de productos vegetales dentro de la Comunidad.
- Directiva 93/61/CEE de la Comisión, de 2 de Julio de 1993, por la que se establecen las fichas que contienen las condiciones que deben cumplir los plantones y material de multiplicación de hortalizas, distintos de las semillas, de conformidad con la Directiva 92/33/CEE del Consejo.
- Directiva 93/62/CEE de la Comisión, de 5 de Julio de 1993, por la que se establecen las disposiciones de aplicación para la vigilancia y control de los proveedores y establecimientos, en el marco de la Directiva 92/33/CEE del Consejo.
- Orden de 28 de Octubre de 1994 (BOE nº 264 del 04-11-94), por la que se aprueba El Reglamento Técnico de Control de la Producción y Comercialización de Plantones de Hortalizas y Material de Multiplicación de Hortalizas, distinto de las semillas.
- Orden de 12 de Diciembre de 2001 (BOJA nº 3 del 08-01-2002), por la que se establecen las medidas de control obligatorias así como las recomendadas en la lucha contra las enfermedades víricas en los cultivos hortícolas.

Las Directivas, Órdenes y Resoluciones afectan y obligan al sector semillero a cumplir lo siguiente:

I. Deberán estar inscritos en los siguientes registros:

- Registro Provisional de Productores de Plantas de Vivero.
- Registro Oficial de Productores, Comerciantes e Importadores de vegetales.
- Registro y Autorización para expedir Pasaportes Fitosanitarios
- Certificado de Autorización para la venta de Semillas y Plantas de Vivero.

II. Disponer de instalaciones adecuadas:

- Aislamiento general de las naves de producción.
- Vados Fitosanitarios. (Uso de batas y/o calzas desechables para visitas).
- Ventilaciones cubiertas con mallas antiparásitas de menos de 1 mm².
- Perímetro de naves cubierto con material impermeable de al menos 1 m de ancho.
- Instalación de desinfección de módulos, bandejas y material auxiliar.

- III. Utilizar semillas debidamente registradas y autorizadas.
- IV. Desinfección mínima dos veces al año de las instalaciones.
- V. Mantener al máximo higiene y limpieza en todo el proceso de producción, naves adyacentes y almacenes.
- VI. Mantener un Registro constante de las semillas sembradas (especie, variedad cantidad, nº lote, entidad productora), de al menos durante un año.
- VII. Llevar un Libro Registro de tratamiento fitosanitarios y abonados realizados manteniéndolo al menos durante un año.
- VIII. Adoptar las medidas necesarias que garanticen la calidad fitosanitaria de semillas, turbas, agua, bandejas y otros medios de producción. Informando de cualquier tipo de anomalía extraña que se presente.
- IX. Expedir el Pasaporte Fitosanitario de todas las plantas que salgan para su trasplante.
- X. Disponer de un Técnico Titulado, Responsable del Control Fitosanitario.

3. INSTALACIONES.

Las primeras instalaciones destinadas a semilleros eran prácticamente iguales a las de un invernadero tradicional, dependiendo de la zona; las mismas estructuras con acondicionamientos para el soporte de bandejas, un sistema de riego manual y la incorporación o no, de una simple máquina de siembra, eran suficientes para la producción de plantas.

Actualmente la exigencia de mayor calidad de plántulas, el alto coste de las semillas híbridas, la mano de obra, la producción estacional, la competencia del sector y la legislación existente, hacen necesario que la instalación o renovación de un semillero sea bien estudiado y proyectado, con la distribución y dependencias necesarias: (invernaderos, oficinas, salas de calefacción, almacén de manipulación, embalse y cabezal de riego, zonas de almacenamiento y desinfección, maquinaria necesaria, vehículos de transporte, etc.), realizando un análisis muy estricto y minucioso de los siguientes puntos:

a) Zona de producción

- Cultivos y épocas de trasplante.
- Volumen teórico de producción.
- Empresas del sector.
- Disponibilidad del factor humano.

b) Características de la finca

- Situación, Red viaria y comunicaciones.
- Superficie y Topografía.
- Suministro de Agua y su Calidad.
- Suministro de Energía Eléctrica y Telecomunicaciones.

c) Climatología de la zona

- Evolución de las temperaturas medias, extremas y estacionales.
- Evolución de la humedad relativa.
- Insolación real y potencial
- Duración del día.
- Pluviometría.
- Régimen de vientos dominantes e intensidad.

3.1. Invernaderos

Las estructuras de los invernaderos destinados a semilleros profesionales han ido avanzando a un ritmo espectacular. Las primeras estructuras tipo “parral” a dos aguas construidos de madera y alambre fueron acondicionadas para la producción de plantas; posteriormente estas mismas estructuras fueron mejoradas introduciendo en su construcción materiales más duraderos y de mayor calidad (tubos galvanizados y vigas o postes de hormigón) dándoles mayor altura y mejorando las ventilaciones laterales e introduciendo ventilaciones cenitales, así como la colocación de doble techo para amortiguar los extremos de temperatura y evitar la caída de agua directamente sobre las plantas “goteo” tan nefasto para las jóvenes plantas.

Actualmente el diseño de forma y dimensionado del invernadero “multitúnel o multicapilla” hace posible un aprovechamiento racional del terreno cubierto. La

facilidad de trabajo, unido a unas grandes posibilidades de aireación-ventilación, permite manejar más fácilmente los factores climáticos o microclima interior de forma manual o totalmente automática, todo ello sin perder robustez y seguridad, pero si consiguiendo unos niveles de estanqueidad y aislamiento altos.

Este tipo de estructuras precisan de una buena nivelación del terreno (muy importante también para la posterior colocación de las banquetas de cultivo o cajas directamente sobre el suelo) y una cimentación de los anclajes, en contrapartida su montaje es muy rápido. Dicha estructura esta realizada a partir de bandas de acero galvanizado, ya sea por procedimiento de galvanizado en caliente o sendzimir, según las piezas que la forman y de acuerdo a una normativa dictada al efecto. Las dimensiones de los módulos de los invernaderos multicapilla actuales y con independencia, según las marcas comerciales son:

- **Anchura:** múltiplos de 6,40-7,00-8,00-9,60-12,00 metros.
- **Longitud:** múltiplos de 2,00 -2,50 metros.
- **Altura bajo canal:** desde 2,80 hasta 4,50 metros.
- **Altura en cumbre:** desde 4,50 hasta 6,50 metros.

Las cubiertas de estos invernaderos de última generación, también han avanzado y mejorado; pasando de los filmes de PE normales, de duración dos campañas, a plásticos térmicos tricapa de duración tres-cuatro años, antigoteo y de gran capacidad térmica. La última tendencia es colocar doble cubierta en techo con cámara hinchable (mayor resistencia a vientos, cámara de aire reguladora de temperatura) y perímetros laterales con placa semirígida de materiales transparentes y más duraderos (PVC - Polimetacrilato- Policarbonato). Existen invernaderos de reciente construcción con cubierta rígida de cristal transparente, sobre estructuras multicapilla simple o doble.



FIGURA 2: Detalle colocación de bandejas en semillero



FIGURA 3: Detalle estructura tipo multitúnel en semillero FUENTE: Invernaderos el pilar.

3.2. Maquinaria de siembra

La maquinaria necesaria para realizar todo el proceso de siembra es:

- Sembradora de precisión o Tren de siembra
- Compresor de aire.
- Turbina de aspiración.
- Bomba de riego y dosificación.

Las sembradoras modernas están formadas por un conjunto de elementos mecánicos, eléctricos y electrónicos, que realizan simultáneamente todas las operaciones de siembra. Este conjunto está formado por los elementos siguientes:

- Mezclador de substratos. Consiste en una tolva de capacidad volumétrica de 500 a 1000 litros de substrato; tiene un molino mezclador mediante unas aspas accionadas por un motor eléctrico y un sinfín elevador que lleva la mezcla realizada (turba rubias, negras, perlita, fibra de coco, o vermiculita) hasta la tolva o modulo de llenado y prensado.
- Alimentador de bandejas. Elemento rectangular de dimensiones similares a la de las bandejas (50 x 70 cm) y con capacidad para 15-30 unidades. Posee un sensor electrónico que nos indica la existencia o no de bandejas; estas pasan al modulo de

llenado y prensado mediante el arrastre mecánico producido por un cilindro neumático o cadena, posicionando correctamente cada bandeja en el lugar y modulo exacto.

- Módulo de llenado y prensado. Módulo que varía en función del tipo de máquina, compuesto generalmente por un sinfín elevador que dosifica la cantidad de sustrato por bandeja; una tolva de recepción, debajo de la cual se sitúa la bandeja y unas aspas giratorias que van llenando y prensando el sustrato. Todo ello esta sincronizado y temporizado, movido por motores eléctricos y un cuadro de mandos.

- Módulo de punzonado. Consta de un puente mecánico sobre el que van instalados uno o dos cilindros neumáticos, que se unen a una plancha de aluminio de 1-2 cm de espesor y de iguales dimensiones a la de la bandeja. Esta plancha contiene en su parte inferior tantos conos invertidos como alveolos tenga la bandeja y en la misma disposición.

Al descender la plancha sobre la bandeja llena de sustrato (según las ordenes recibidas de los sensores de siembra), marca unas hendiduras de 1 a 2 cm de profundidad en cada alveolo, (profundidad regulable según la semilla a sembrar). Existen también las sembradoras de tambor donde el punzonado lo realiza un rodillo con conos invertidos, al avanzar la bandeja sobre el tren de siembra.

- Cabezal de siembra. Esta parte del tren de siembra es la que más modificaciones ha sufrido, siempre buscando mayores rendimientos y precisión. Se ha pasado de la siembra manual de los inicios, por las máquinas semiautomáticas de casetes, los cabezales semiautomáticos de librillo, hasta llegar a los modernos cabezales de siembra automáticos. Rendimientos de: 250-400 bandejas/hora.

Estos últimos constan de una parte fija llamada pulpo, formada por una placa superior perforada en forma de embudo que une mediante tubos de P.E. la placa inferior, donde cae la semilla y mediante una compuerta neumática que se abre deja la semilla en cada alveolo; y una parte móvil con depósito de semilla, placa perforada de aspiración, vibrador, peine de barrido y elemento de soplado de semilla, todo un complejo perfectamente armonizado y controlado por un autómata.

Las sembradoras de tambor son aptas para semillas redondas y partidas de semillas grandes, obteniéndose muy buenos rendimientos: 450-800 bandejas/hora.

- Módulo de tapado. Pequeña parte simple pero de gran importancia en el proceso de siembra. Está compuesto por una tolva de forma troncopiramidal que en el fondo lleva una apertura para dejar caer el material para cubrir las semillas sembradas (perlita o vermiculita). Su capacidad de 50-60 litros permite tapar entre 50-60 bandejas. Junto a la tolva lleva un raspador por su parte posterior que elimina el material sobrante, dejándolo caer sobre un depósito para recogerlo y reutilizarlo. El sistema puede ser temporizado y automático.

- Túnel de riego. Campana o túnel de 1-2 m (capacidad para 2-4 bandejas) que tiene instaladas en su techo 6-8-10 electroválvulas con sus correspondientes boquillas de riego de caudal 0,9-1,2 L/min/ud. El sistema lleva instalado un temporizador y un dosificador volumétrico que inyecta junto con el agua de riego el primer tratamiento fungicida de vital importancia, previo a la germinación.

- Apilador de bandejas. Conjunto de elementos electromecánicos que van recogiendo y agrupando las bandejas sembradas en torres de 8-10-12 uds según la cantidad deseada, y sacándolas sobre el carril de rodillos del final del tren, para su posterior paletizado y marcaje de partidas.

Todo el conjunto puede estar informatizado y robotizado. Los rendimientos de siembra deben de ser de: 250-400 bandejas/hora (2 operarios).

3.3. Cámara de germinación

Es un recinto cerrado de características similares a cualquier cámara frigorífica donde se introducen las bandejas sembradas y se mantienen durante un tiempo determinado en condiciones óptimas de germinación, manteniendo los parámetros necesarios, (temperatura y humedad relativa) para la germinación de las distintas especies de semilla (ver tablas de cultivo, cuadro nº 2) y obtener así el mayor porcentaje de estas, en plantas viables.

El dimensionamiento y capacidad de la cámara dependerá del volumen de producción previsto del semillero y de las especies a producir (cantidad de bandejas sembradas diarias y días necesarios de germinación).

Su construcción puede realizarse de obra civil recubierta de materiales termoaislantes o paneles prefabricados termoaislantes, constará de una o dos puertas, para entrada y salida. La maquinaria necesaria para mantener el microclima interior es: un equipo de aire acondicionado reversible (frío-calor), un equipo humidificador (fog-sistem), sondas de temperatura y de humedad relativa, cuadro de automatismos con termostato e higróstico de lectura y control.

3.4. Cámara de cultivo

Recinto de similares características a la cámara de germinación, normalmente de dimensiones más pequeñas. La gran diferencia está en la incorporación y control de un tercer parámetro: la luz. Su función es mantener constantes los parámetros de: temperatura, humedad relativa y luz, en condiciones ideales que favorezcan el enraizamiento de esquejes o prendimiento de injertos, ya que se trabaja con plantas vivas y no con semillas; llevando un seguimiento y control muy exhaustivo de los parámetros mencionados.

La colocación y disposición de las bandejas en la cámara también es distinta, estando aquí, sobre estanterías fijas o móviles con separación suficiente entre bandejas que permitan recibir las condiciones: temperatura, humedad y luz (artificial), de forma uniforme. La dimensión será la que permita introducir la producción de un solo día, para evitar abrir puertas y cambiar las condiciones una vez iniciado el proceso de enraizamiento o prendimiento. Se instalarán tantas cámaras como necesidades de producción se tengan.

3.5. Taller de injertos.

Es el lugar donde se realiza la técnica de injertado, manteniendo unas condiciones climáticas buenas, tanto para el personal que realiza dicha labor, como para las plantas a injertar. Según el método o tipo de injerto a realizar, consta de una gran mesa o varias mesas unitarias, en ellas se dispone de todo el material necesario para injertar: pinzas, bandas de estaño, bisturíes, cuchillas, etc. y se colocan las distintas plantas, tanto del patrón como de la variedad a injertar. Es imprescindible la instalación de luz artificial que facilite la visión de los injertadores, al ser un trabajo de gran precisión.

En esta fase se realiza una previa clasificación del material vegetal desde el punto de vista productivo del melón cumpliendo una serie de criterios que se han de tener en cuenta para elegir la variedad correcta:

- Exigencias de mercado de destino.
- Características de la variedad comercial: vigor de la planta, resistencias a plagas y enfermedades, calidad interna y externa del fruto, conversación.

3.5.1. Injertos.

Son plantas que han sido modificadas mediante la técnica de injertado permitiendo cultivar especies sensibles a ciertos patógenos, sobre suelos infectados, utilizando el sistema radicular de patrones resistentes y la parte aérea de la variedad.

Los portajinjertos o patrones utilizados deben cumplir las siguientes cualidades:

- Resistencia a la enfermedad limitante del cultivo.
- Resistencia o tolerancia a otros patógenos del suelo.
- Vigor y rusticidad.
- Gran afinidad con la variedad a injertar.
- Buenas características para realizar el injerto.
- No modificar la calidad externa e interna del fruto.

3.5.1.1. Tipos de injertos.

Los métodos de injertar o tipos de injerto sobre especies hortícolas pertenecientes a las familias de Cucurbitáceas y Solanáceas son:

- Injerto de aproximación
- Injerto de cuña.
- Injerto de empalme

El método más utilizado en el melón es el de aproximación, que si lo desean, se puede dejar a dos tallos. Esta técnica se utiliza fundamentalmente para evitar los problemas de *Fusarium*, Cribado y en algunas zonas por la alta salinidad del agua de riego.

Para obtener éxito en la técnica de injertado, debemos tener presente:

- Orden o formación de la siembra del patrón y la variedad.
- Extremar los cuidados durante el injertado y periodo de prendimiento.
- Controlar el desarrollo del crecimiento.

3.6. Banquetas de cultivo

Las banquetas o mesas de cultivo, son estructuras construidas dentro del invernadero, a una determinada altura del suelo (50-70 cm), perfectamente niveladas, donde se colocan las bandejas extendidas, ya pregerminadas, recibiendo las labores y tratamientos necesarios para terminar su ciclo de crecimiento hasta el momento adecuado de su trasplante.

Existen varias formas de construir y disponer las mesas, dependiendo de su coste, pasillos interiores, etc., enumerando las siguientes: estructura de alambre galvanizado montado sobre tubos galvanizados; tubos galvanizados horizontales montados sobre tubos verticales; viguetas de hormigón montados sobre bloques directamente o sobre postes de hormigón; perfiles de galvanizado montados sobre postes de hormigón, perfiles de PVC reforzado, montado sobre postes de hormigón, PVC o bloques. De todos ellos, los más utilizados son los dos últimos. La existencia de banquetas de cultivos, obedece a una serie de ventajas frente a colocar y extender las bandejas en el suelo; estas son:

- Fácil manipulación de bandejas.
- No hay riesgo de encharcamiento.
- Mayor aireación.
- Facilidad de instalar mangueras de calefacción (aire o agua).
- Rapidez en la localización de partidas.
- Mayor comodidad y rendimiento de trabajo.



FIGURA: 4. Detalle de banqueta de cultivo. FUENTE: Horticom.

3.7. Sistemas de riego

El riego de un semillero tiene prácticamente la misma configuración que una explotación hortícola y ornamental, estando formado por las siguientes unidades básicas: embalse, cabezal de riego, red de alimentación y sistema de distribución del agua. El sistema o forma de distribución del agua de riego será el que nos definirá el llamado “sistema de riego”, encontrando grandes diferencias de uno a otro sistema (riego por inundación, goteo, aspersion, microaspersión, etc).

Básicamente y dada la alta densidad de plantas por metro cuadrado, las formas más comunes de distribuir el agua en cualquier semillero se puede catalogar en dos:

- “sistema de inundación”
- “sistema de microaspersión”

Con las variantes siguientes:

- Riego manual (con manguera). Sistema manual tradicional, e imprescindible y complementario con cualquier otro sistema, la eficacia y éxito depende exclusivamente de la persona o personas que lo realizan.
- Microaspersión fija. Sistema formado por un conjunto de tuberías generales, ramales portaaspersores y microaspersores, dispuestos al marco necesario, según características del fabricante (alcance, caudal, etc.) y colocados hacia arriba o hacia abajo sin producir goteos perjudiciales.
- Trenes de riego. Consiste en una barra pulverizadora transversal que se desplaza longitudinalmente mediante unas ruedas sobre un raíl colgado de la estructura del invernadero, accionado por un motorreductor eléctrico, dos poleas y un cable de tracción. La barra pulverizadora está compuesta por un tubo de PVC y un conjunto de boquillas pulverizadoras antigoteo instaladas cada 25-50 cm, unido todo ello a un perfil de aluminio y al cuadro de mandos. El conjunto dispone de sensores que accionan la barra pulverizadora, mediante la colocación de electroimanes y electroválvulas, realizando una distribución uniforme del agua de riego.
- Riego por inundación. (flujo-reflujo). Sistema de gran caudal, con recogida de la solución nutritiva. Instalación pensada para cultivos hidropónicos.

3.8. Sistemas de tratamientos fitosanitarios

Independientemente de adoptar todas las medidas profilácticas, medidas culturales y métodos de barrera de prevención, se hace necesaria la implantación de un programa de tratamientos fitosanitarios capaz de conseguir y mantener la sanidad y calidad fitosanitaria de las plántulas. Para ello se dispone de sistemas de tratamientos fitosanitarios, que utilizados solos o conjuntamente nos garanticen la obtención de plantas sanas y vigorosas; estos son:

➤ Inyección proporcional. La instalación de uno o varios depósitos de mezclas, y su bomba de inyección correspondiente, son los elementos necesarios para incorporar los productos fungicidas y/o insecticidas en la red de riego para su distribución.

➤ Pulverización de alto volumen. Sistema tradicional más o menos sofisticado, presente en todas las instalaciones; compuesto por: depósito de mezclas, motobomba de presión y red de distribución. La aplicación se realiza con pistoletas de diversas formas y tipos de gota, de alto volumen, pulverizando directamente sobre las plantas cultivadas.

➤ Nebulización de ultrabajo volumen. Los productos fitosanitarios diluidos en un pequeño volumen de agua son distribuidos con una boquilla de alta presión, produciendo una finísima niebla, que uno o varios ventiladores reparten por todo el volumen del invernadero. Son tratamientos generales no localizados, de alta eficacia, permitiendo su programación fuera del horario de trabajo y con el invernadero herméticamente cerrado. El sistema dispone de mecanismos como: autolimpieza de boquillas, preventilación, removedor y detector final del producto.

3.9. Climatización

La correcta interpretación y manipulación de los siguientes parámetros: luz, temperatura y humedad, tanto externa como interna, nos darán las condiciones deseadas para la producción de plántulas; teniendo muy en cuenta que una ligera modificación de cualquiera de ellos, influye directamente y afecta a todos los demás.

El acondicionamiento del microclima interior de las instalaciones hay que diferenciarlo en dos grandes periodos, en nuestra zona de producción (Costa Almería) y estos coinciden con ciclos de producción de plantas distintos:

A. Periodos cálidos: primavera -verano (abril - septiembre).

B. Periodos fríos: otoño - invierno (octubre - marzo).

A. Periodos cálidos.

La gran radiación solar recibida y las altas temperaturas alcanzadas, hacen difícil obtener los rangos óptimos de los parámetros de producción, siendo la disminución de temperatura el mayor problema de estos periodos, que resolveremos utilizando conjuntamente las técnicas siguientes:

A.1. Reducción de radiación solar. Aplicando métodos de sombreado, sobre la cubierta del invernadero, que pueden ser: Estáticos (encalado de cubierta o colocación de mallas) o dinámicos (instalación de pantallas de sombreado o aluminizadas, colocadas en interior o exterior).

A.2. Ventilación. Ventilación pasiva: Instalación de ventanas cenitales en todas las cubreras o laterales. Ventilación activa con la incorporación de ventiladores para recirculación interna del aire, y extractores laterales.

A.3. Refrigeración por agua. Instalación de sistemas para enfriar el aire:

- Ventiladores-Nebulizadores de media presión.
- Foog-System: nebulización a alta presión.
- Cooling-System: paneles húmedos y extractores de aire.

B. Periodos fríos

La baja iluminación y mantener la temperatura nocturna y diurna en unos niveles óptimos para el desarrollo de las plántulas, se consigue con una buena hermeticidad del invernadero, instalación de doble cámara y el apoyo de un sistema de calefacción.

B.1. Calefacción. Dependiendo de las exigencias del cultivo se instalarán sistemas de calefacción por aire o agua, teniendo presente que la instalación sea capaz de mantener uniforme y constante la temperatura mínima prefijada, fiable y segura.

B.2. Sistemas de aire: generadores con quemador de combustible, cámara de combustión, ventilador o turbina de impulsión, distribuyendo el aire caliente.

B.3. Sistemas de agua: caldera, quemador de combustible, colector, bombas de impulsión, tuberías generales de impulsión y retorno, tuberías de distribución y tubos de emisión calorífica (lisos, corrugados, aluminio, acero), formando un circuito cerrado.

4. MATERIALES.

Los distintos materiales y materias primas necesarias para realizar la transformación del material base “la semilla” en plantas óptimas para su trasplante lo componen: substratos, bandejas, fundas y otros materiales accesorios.

4.1. Substratos

Dependiendo del tipo de suelo de cultivo final de la planta, se utilizarán substratos a base de: turba, perlita, termita, fibra de coco, lana de roca o la mezcla entre ellos. La elección de cualquier substrato debe cumplir las siguientes propiedades:

- Libre de patógenos y gérmenes.
- Excelente porosidad, permitiendo gran aireación y capacidad de retención.
- pH regulado y adecuado a los cultivos.
- Elevada capacidad de intercambio iónico.
- Baja salinidad.
- Estabilidad de la estructura.

El material más utilizado son las turbas, y sus mezclas varían según los cultivos y la época de producción, diferenciando principalmente y a título orientativo:

- Campaña de invierno; mezcla compuesta por:
 - Turba rubia: 80-90%
 - Turba negra-parda: 10-20%
 - Perlita gruesa: 10-15%
- Campaña de verano; mezcla compuesta por:
 - Turba rubia: 60-70%
 - Turba negra-parda: 30-40%
 - Perlita gruesa: 15-20%

El porcentaje de mezcla de los distintos materiales es orientativa y oscilará según el tipo de alveolo, sistema de riego, planta a producir, a criterio de la dirección técnica.

4.2. Bandejas y fundas

Las bandejas son el soporte necesario para el cultivo en semillero. Normalmente se utilizan bandejas de poliestireno expandido (porespam) de color blanco, con un número determinado de alvéolos, maceteros de plástico y en menor medida tacos de turba prensada.

El tipo de alvéolo depende de la planta a sembrar de forma y el tamaño de su sistema radicular, así como las limitaciones del tiempo y el espacio disponible en el semillero. Por tanto su tamaño está directamente relacionado con el control del crecimiento de la planta (Wien, 1997) siendo otro factor que interviene en la calidad de la plántula.

4.3. Otros materiales

El semillero deberá estar dotado además de los siguientes materiales:

- Envases de cartón, plástico y bolsas de plástico para embalajes.
- Tablillas identificativas.
- Fertilizantes y productos nutricionales.
- Productos fitosanitarios.

5. CULTIVOS.

El semillero profesional como especialista en su sector, puede realizar el cultivo de cualquier especie hortícola solicitada por sus clientes horticultores. Centrándose en la zona del litoral mediterráneo, las principales especies cultivadas son: pimiento, tomate, berenjena, melón, sandía, injertos de: sandía, melón, pepino y tomate, lechuga, col china, coliflor, brócoli, apio, etc., distinguiendo dos campañas anuales de producción muy diferenciadas, sobre todo en la horticultura intensiva almeriense.

Los porcentajes de siembra de las especies varían anualmente de unas zonas a otras.

Los cuadros I, II, III reflejan algunos datos de interés de las especies más cultivadas.

Especies	Tª mínima °C		Tª óptima °C			Tª germin. °C		Tª maxim °C	Humedad relativa
	Letal	Biológica	Día	Noche	Subst.	Mínim.	Óptim.	Días	Días
Pimiento	0 / 4	10 - 12	22 - 28	16 - 18	15 - 20	12 - 15	25 - 30	28 - 32	65 - 70
Tomate	0 / 2	8 - 10	22 - 26	13 - 16	15 - 20	9 - 10	25 - 30	26 - 30	55 - 60
Berenjena	0 / 2	9 - 10	22 - 26	15 - 18	12 - 18	13 - 15	25 - 30	30 - 32	65 - 70
Col china	0 / 5	3 - 5	17 - 20	12 - 15	15 - 20	8 - 10	15 - 25	30 - 32	65 - 70
Melón	0 / 2	12 - 14	24 - 30	18 - 21	20 - 22	10 - 13	20 - 30	30 - 34	70 - 90
Sandía	0 / 2	10 - 13	24 - 30	18 - 21	20 - 21	10 - 12	20 - 30	30 - 34	65 - 75
Injertos	0 / 2	10 - 13	24 - 30	20 - 25	20 - 25	--	25 - 30	30 - 35	85 - 90

CUADRO 1: Temperaturas óptimas de las especies más cultivadas.

Fuente: Camacho F., 2003

Cultivos	Cámara germinación			Germinación	Nascencia	1ª hoja Verdadera	Transplante
	Horas	Tª °C	H.R.%	Horas	Días	Días	Días
Pimiento	120	25	75	120	7	16 - 19	32 - 45
Tomate otoño	48	25	85	72	4	16 - 18	30 - 35
Tomate primav.	48	25	85	72	4	12 - 15	25 - 30
Berenjena	72	25	85	72	4	15 - 17	25 - 35
Col china	--	--	--	24	2	7 - 10	25 - 35
Lechuga	30	14	90	24	2	6 - 7	20 - 25
Melón	72	25	85	48	3	15 - 18	25 - 35
Sandía	96	25	85	72	4	16 - 18	35 - 45

Cuadro 2: Periodos de tiempo necesarios para las especies más cultivadas.

Fuente: Camacho F., 2003.

Cultivos	Nº semillas	Profundidad	Semilla	Germinación	Plantas
	Gramo	cm.	Ha (gr)	%	Ha
Pimiento	120 - 150	0,5 - 1	0,2	80 - 95	20000 - 30000
Tomate	250 - 300	0,5 - 0,75	0,09	75 - 90	15000 - 25000
Berenjena	200 - 250	0,5 - 1	0,1 - 0,2	80 - 95	5000 - 7500
Col china	250 - 400	0,5	0,3	90 - 95	20000 - 30000
Lechuga	600 - 1200	0,3	0,1	90 - 95	80000 - 100000
Melón	25 - 30	1 - 1,5	0,5	85 - 95	5000 - 10000
Sandía	15 - 25	1 - 1,5	0,25	75 - 90	2500 - 7500

Cuadro 3: características de las especies más cultivadas.

Fuente: Camacho F., 2003

a. Campaña de primavera-verano. Se realizan básicamente seis especies, con sus diferentes tipos de cultivos y multitud de variedades: pimiento, tomate, berenjena, pepino, calabacín y judía verde.

b. Campaña de otoño-invierno. Las principales especies más cultivadas son: tomate, pepino, melón, sandía, sandía injertada y col china.

6. LABORES DE CULTIVO.

Las operaciones o labores de cultivo que se realizan durante el proceso del semillero son varias, todas ellas de vital importancia y correctamente coordinadas. Debido a tener un ciclo de cultivo relativamente corto (normalmente 30-35 días, con un máximo de 50-60 días), las operaciones se han de realizar en el momento adecuado, teniendo poco margen para corregir posibles errores.

Destacaremos los trabajos más imprescindibles, siendo éstos los siguientes:

- Riego.
- Fertilización.
- Tratamientos fitosanitarios.

6.1. Riego

Esta operación quizás sea la más complicada de definir y cuantificar; ya que no existe norma exacta, en cuanto a cantidad y frecuencia de riegos, que se han de aplicar a las plantas, porque éstos dependerán de muchos factores: especies de cultivo (incluso variedades), estado fenológico, época de siembra, tipo de bandeja, mezcla de sustrato, condiciones climatológicas, sistema de riego, tipo de estructura, etc.

Se aplicaran los riegos necesarios, en cantidad y frecuencia según criterio del Técnico de explotación, evitando en cualquier caso los encharcamientos, tan nefastos, para las pequeñas plantas, así como las posibles deficiencias.

A modo de orientación, se aconsejará regar diariamente en primavera y verano (evitar realizar los riegos en las horas de mayor insolación y temperatura), y cada dos-tres días en invierno, procurando regar siempre por las mañanas.

6.2. Tratamientos fitosanitarios

Los tratamientos fitosanitarios comienzan desde el momento de siembra, con la incorporación del primer tratamiento fungicida en el agua de riego. El planteamiento y la programación de un calendario de tratamientos, será la forma más eficaz de combatir las plagas o enfermedades que atacan a las plántulas, en cada uno de sus estados de desarrollo en semillero.

Estos estados a los que hacemos referencia son: estado de dos cotiledones, estado de 1-2 hojas verdaderas, estado de 3-4 hojas, estado de planta desarrollada, estado planta adulta.

La realización de los tratamientos debe hacerse siempre de forma preventiva, evitando grandes infecciones de difícil curación; para ello debemos conocer los patógenos que atacan a los cultivos en sus diferentes épocas.

6.2.1. Campaña de Primavera-Verano.

La incidencia de plagas es muy superior al de enfermedades, ya sean aéreas o de raíz-cuello, además no solamente por el daño directo que realicen sobre las plantas sino por la posibilidad de transmisión y contagio de ciertas virosis de gran importancia de daños.

Plagas. Las principales son: Trips, Submarino, Mosca blanca, Orugas y Gusanos de suelo. Todos ellos se combaten con productos específicos existentes en el mercado o con mezclas entre ellos siempre teniendo en cuenta que estamos manipulando plántulas, donde las mezclas, dosis, etc., pueden ser citotóxicas.

Enfermedades. Las principales son: Pythium, Rizoctonia, Botritis y Bacteriosis.

6.2.2. Campaña de Otoño-Invierno.

Al contrario que en primavera-verano, la incidencia de plagas es menor debido a que las condiciones climatológicas son adversas para su desarrollo, pero si muy favorables para el desarrollo de diversos hongos que provocan ciertas enfermedades, algunas de gran importancia por los daños causados.

- Plagas. Las principales son: Mosca blanca, Trips.
- Enfermedades raíz-cuello. Tenemos: Pythium, Rizoctonia.
- Enfermedades aéreas. Mildiu, Oidio, Botritis, Mycosphaerella y Alternaria.

Los tratamientos fitosanitarios se realizarán a última hora del día para evitar fitotoxicidad, la mayoría de ellos serán de carácter general para todos los cultivos existentes y otros de carácter específico, contra alguna plaga o enfermedad de un determinado cultivo, siempre con productos registrados y autorizados.

7. PROCESO DE PRODUCCIÓN.

El objetivo de cualquier semillero hortícola es conseguir plantas de gran calidad:

- Sanas
- Ricas en materia seca
- Compactas
- Homogéneas
- Buena relación tallo/raíz

Para conseguirlo deberemos seguir y controlar cada paso de proceso productivo:

- **Recepción correcta de semilla.**
 - **Datos del cliente:** Razón social, CIF, domicilio y teléfono.
 - **Datos de semilla:** Especie, variedad, nº de lote, cantidad, fecha de siembra o trasplante, productor y tipo de bandeja.
- **Registro de siembra.**

Realizar el programa de siembra diario, según especies y variedades iguales y tipo de bandejas; numerando las distintas partidas, este proceso normalmente lo realiza el sistema informático automáticamente.
- **Siembra.**
 - Comprobación completa del tren de siembra.
 - Realizar las mezclas de sustrato adecuadas, homogéneas, con un llenado y prensado de cepellones uniforme.
 - Punzonado centrado y profundidad deseada.
 - Siembra completa sin fallos ni alveolos dobles.
 - Tapado de semilla y raspado posterior.
 - Riego regular y uniforme (de vital importancia) incorporando 1^{er} tratamiento fungicida (Previcur 1 cc/L = 3 cc/m² de pc).
- **Paletizado y control de partidas.**
 - Recogiendo las bandejas sembradas (bloques de 5-10 unidades) se paletizan, tapándose unas con otras evitando resecciones, terminado el palet (80-100 ud) se tapan las últimas bandejas sembradas, con bandejas vacías.
 - Marcaje de todas las partidas con datos donde aparezca el nº de partida, la cantidad de bandejas sembradas, fecha de siembra así como la especie. Esta información estará detallada en tablillas localizadas en cada una de las partidas, además hay que realizar un recuento perfecto de unidades sembradas, comprobación y anotación en partes de siembra.

➤ **Cámara de germinación.**

Se introducen los palets inmediatamente después de la siembra en cámara con las condiciones ideales.

Las condiciones generales para que las semillas germinen son:

- TEMPERATURA: 25 - 27 °C.
- HUMEDAD RELATIVA: 80 - 90%

➤ **Control de la fertirrigación.**

Se programa el riego según sus necesidades, previa observación al plantel, controlando el pH (6-6,5) y la CE (agua + 1-1,5 puntos en dS/m).

Se recomienda regar a primera hora de la mañana y realizar un repaso de orillas y fallos a primera hora de la tarde.

➤ **Tratamientos fitosanitarios.**

Realizar un programa de tratamientos semanal, incidiendo sobre los patógenos más activos o difícil de combatir, ya sean insectos, hongos o bacterias.

Tratar siempre que sea posible por la tarde a última hora.

➤ **Control de salida y expedición.**

Comprobación el estado fenológico y sanitario de la planta a su salida. Así como expedirla adecuadamente con su embalaje y protección necesaria.

La constante vigilancia de los distintos módulos de cultivo del invernadero y el control de sus parámetros climáticos: luz, temperatura y humedad; el orden y limpieza; el control de la fertirrigación, la observación diaria de las plántulas (sistema radicular, longitud de entrenudos, tamaño de hoja, color de la misma, incidencia o presencia de plagas o enfermedades); y la realización de tratamientos fitosanitarios adecuados, nos darán como resultado una planta con gran calidad y garantía fitosanitaria.

8. VENTAJAS QUE PROPORCIONAN LOS SEMILLEROS.

La obtención de plántulas en semilleros, especialmente de aquellas variedades hortícolas que se van a cultivar en invernaderos, trae consigo una serie de ventajas que a continuación se expresan por su importancia:

- ❖ Se puede efectuar la siembra en semillero sin haberse preparado el terreno de asiento.
- ❖ La planta germina sin dificultad en el semillero y se desarrolla en un medio adecuado a sus necesidades (temperatura y humedad).
- ❖ Puede ser controlado su crecimiento, por tratarse de superficies reducidas.
- ❖ El riesgo se efectúa más fácilmente de acuerdo con sus exigencias.
- ❖ Las pérdidas por plagas y enfermedades son menos frecuentes por permitir controlarlas sin ninguna dificultad.
- ❖ Para la reposición de “fallos” sobre el terreno de asiento, se dispone de plantas de igual desarrollo.
- ❖ Mayor rentabilidad del terreno de asiento, al permitir su explotación mediante otro cultivo, al tiempo que las primeras fases del crecimiento de un nuevo cultivo se va desarrollando en el semillero.
- ❖ Mayor precocidad de frutos al permitir el semillero el desarrollo de las plantas, pues de efectuarse sobre el terreno de asiento, se tendrá que realizar en épocas más tardías libres de heladas.

8.1. Normas generales para una buena germinación

Para conseguir la mejor germinación de las semillas, tenemos que tener en cuenta una serie de nociones.

La semilla ha de estar limpia, sin restos de frutos, ya que estos actúan como inhibidores de la germinación. Eliminar latencias dando frío (rompe la latencia interna) y el estratificado lo que hace es mantener húmeda la cáscara para favorecer la penetración de la humedad hasta el embrión, para ellos se mantienen en cámara de germinación 24 horas, después de la siembra.

8.2. Tiempo en semillero.

Este tiempo, es el tiempo que tardará la planta en estar lista para el trasplante. Se debe prestar especial cuidado a dicho tiempo, ya que trasplantar una planta pasada o demasiado pequeña será el inicio de una serie de problemas en el cultivo que tendrá difícil solución.

El tiempo que pasa de una planta en el semillero depende en su mayor parte de las condiciones climáticas. Para cada especie, el tiempo que transcurre es diferente, para el melón (*Cucumis melo*) sería:

FECHA SIEMBRA	DIAS PARA EL TRANSPLANTE
1-15 noviembre	41-45
15-30 noviembre	41-45
1-15 diciembre	44-48
15-31 diciembre	48-52
1-15 enero	48-52
15-31 enero	43-47
1-15 febrero	38-42
15-28 febrero	33-37

CUADRO 4: Posibles fechas de siembra para melón y tiempo en semillero

9. DESARROLLO DE PLÁNTULAS.

En la producción de plántulas se requiere atender a todos los detalles desde la siembra hasta la retirada para el trasplante. Para ello, el desarrollo se divide en cuatro etapas:

- Etapa 1. Comprende al periodo que transcurre entre la siembra y la emergencia de la radícula a través de la cubierta de la semilla. En esta etapa se requieren niveles altos de humedad y oxígeno alrededor de la semilla, abarca los procesos de germinación fisiológica y se desarrolla normalmente en el interior del sustrato, por lo que es difícilmente controlable.
- Etapa 2: es el periodo entre la emergencia de la radícula que penetra en el suelo o sustrato y la emergencia del hipocotilo (tallo) y las hojas de los cotiledones. Durante esta etapa aumentan las necesidades de oxígeno de la raíz y, por tanto debe disminuirse la cantidad de humedad suministrada. Comienza con la emergencia visible del vástago de la plántula y termina con la expansión total de las hojas cotiledóneas.
- Etapa 3: es el periodo de crecimiento y desarrollo de las hojas verdaderas. Demanda un abastecimiento adecuado de nutrientes, de humedad y la regulación de los factores de crecimiento. La duración de esta etapa es variable para las diferentes especies y está condicionada por el nivel de diferenciación vegetativa en que se realice el trasplante.
- Etapa 4: esta etapa corresponde al periodo previo al trasplante. Incluye condiciones adecuadas para el almacenamiento o mantenimiento de las plántulas en el semillero. Tiene una duración variable en función de la programación y necesidades del agricultor, y frecuentemente es el momento en el que se efectúa el acondicionamiento y endurecimiento de las plántulas.

Las etapas 1 y 2 son las más críticas, dependiendo fundamentalmente de las condiciones dadas de humedad y luminosidad, mientras en las etapas 3 y 4 se actúa para efectuar un acondicionamiento nutritivo que permita modificar y controlar los patrones de diferenciación y crecimiento de las plántulas y condicionar su respuesta al estrés post-trasplante.

9.1. Acondicionamiento y control.

Es posible regular la velocidad de crecimiento de las plántulas en semillero regulando la concentración de nitrógeno y otros nutrientes en el sustrato de cultivo. Se han sugerido dos formas de nutrición.

- La primera forma, se mantiene baja la velocidad de crecimiento con niveles bajos de nitrógeno, incrementando estos antes del trasplante.
- La segunda forma, la más utilizada, se centra en los niveles adecuados de nutrientes durante el crecimiento temprano de las plántulas y su disminución antes del trasplante. La disminución de los valores de nitrógeno ha de ser paulatina para que no decrezca la velocidad de crecimiento post-trasplante, ni en la posterior cosecha.

10. ENFERMEDADES DE LOS SEMILLEROS.

En general, se conocen como enfermedades de semillero a distintas patologías que tiene como característica común el presentarse en los primeros estados del desarrollo de la planta ocasionando la muerte o caída de las plántulas (*damping-off*) o dando lugar a plantas de escaso desarrollo y nulo valor comercial (Avilés, *et al* 2002).

Pero los semilleros necesitan consideraciones específicas que atañen a todo el proceso productivo. Así, las semillas de las solanáceas pueden ser portadoras de diferentes patógenos, algunos de difícil control. Patógenos, por otro lado, que puede no manifestarse durante el tiempo que permanecen las plántulas en las almácigas (semillero).

Esto nos permite dar entrada a la especial sensibilidad que atañe a las solanáceas, en especial a pepinos, melones y sandías que sufren los daños causados por ciertos hongos típicos de los semilleros. *Pythium* y *Rhizoctonia solani*.

- ❖ *Pythium aphanidermatum*, en los cultivos de pepino es un patógeno que marchita a las plantas en el semillero y en el terreno de asiento, cuando aquellas están en plena producción. Esta especie solo presenta estas características durante las épocas cálidas. Mientras que *P. irregulare* las realiza en las épocas frías.
- ❖ *Rhizoctonia solani* causa enfermedad y muerte sobre plántulas y plantas en plena producción de pepino y melón. Tanto *Pythium* y *Rhizoctonia* son transportados por turbas, agua de riego y por las masas de polvo que el aire mueve.

En el caso de las solanáceas son señeros los ejemplos que proporcionan algunas bacterias *Clavibacter michiganensis* spp *michiganensis* entre otras y ciertos virus como es el caso del mosaico del tomate, TMV; moteado suave del pimiento, PMMV; portados por las simientes y cuya manifestación sintomatológica ocurre en pleno cultivo.

Obviamente, este problema tiene dimensiones diferentes cuando el semillero es individual, hecho por cada agricultor, o las plantas se producen en grandes explotaciones, denominadas legalmente planteles.

En un plantel para solanáceas, hay que considerar, por lo tanto una serie de vías de entrada de patógenos establecidos o no en la zona donde aquel esté situado. Son de obligado cumplimiento la instalación de mallas para evitar la entrada de insectos transmisores de virus. Ejemplos de estos vectores son *Frankliniella occidentalis* y *Bemisia tabaci*.

Otro aspecto a tener en cuenta son las turbas y sustratos, componentes esenciales en el establecimiento de un semillero. Su sanidad no está garantizada y algunos patógenos pueden ser introducidos a través de este medio.

Con una importancia secundaria se han considerado el agua de riego y los vientos pero ambas vías son, sin duda el vehículo tanto de patógenos de la parte aérea

siendo el caso de *Botrytis cinérea* y varias especies causantes de oídio como de hongos típicamente telúricos *Fusarium oxysporum fsp lycopersici*.

Tanto en semilleros como en siembras directas, siguen teniendo una clara relevancia *Pythium* y *Rhizoctonia solani*. Para su control, se recomienda mediante desinfecciones de la cama de siembra, deberá ser apoyado con fungicidas específicos bien aplicados a la semilla antes de sembrar o al pie de las plántulas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. EMPLAZAMIENTO DEL ENSAYO.

1.1. UBICACIÓN DEL SEMILLERO.

Este ensayo ha sido realizado gracias al aporte de material vegetal cedido por el Semillero El Plantel, delegación en la Mojonera, situado en la Carretera de Las Norias, N° 15 (paraje de Las Cámaras) perteneciente al término municipal La Mojonera de Almería.

Contando además con las delegaciones de San Agustín en El Ejido, así como en los términos de Dalias y Berja.



FIGURA 5: Localización de El Plantel semilleros.

1.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMILLERO.

El Plantel Semilleros produce anualmente unos 30 millones de plantas, dentro de los cuales cobra mayor importancia la producción de pimiento y de injertos de tomates, siendo uno de los semilleros la referencia de la provincia en estas áreas de producción.

Además, se producen otras variedades hortícolas como pepinos (*Cucumis sativus*), judías (*Phaseolus vulgaris* L), berenjenas (*Solanum melongena* L), sandías (*Citrullus lanatus* (Thunb)), melones (*Cucumis melo*),... y plantas ornamentales como son los geranios (*Pelargonium*) y poinsetias (*Euphorbia pulcherrima*)....

El Plantel ofrece sus centros equipados con la tecnología necesaria para garantizar el control de las condiciones climáticas.

Del equipamiento de los invernaderos destaca es especialmente el empleo de trenes de riego completamente informatizados, con los que se consigue un elevado

grado de uniformidad a la hora del riego, ya que garantiza el reparto homogéneo del agua por toda la bandeja.

Unos de los éxitos que caracteriza al semillero es la técnica de germinación, ya que han conseguido uno de los índices de aprovechamiento de la planta útil más significativos de Almería.

Actualmente disponen de tres cámaras de germinación apropiadas para cada tipo de cultivo y que precisaron en su momento de una importante inversión económica.

1.2.1. Exportación e importación

La mayoría de los clientes de El Plantel Semilleros ejercen su actividad en la zona del poniente almeriense. Sin embargo, gracias a su trayectoria, ha conseguido ya clientes por toda la provincia y en regiones vecinas, como pueden ser Murcia y Granada.

1.2.2. Sistema de riego.

El sistema de riego está compuesto por un cabezal dotado de un equipo de riego que nos permite dosificar perfectamente los fertilizantes.

Asimismo consta de trenes de riego, este sistema es hoy por hoy el sistema de riego que mejor se adapta a los semilleros permitiendo un ahorro en mano de obra y una mayor eficacia y uniformidad de las partidas si lo comparamos con los métodos tradicionales de riego con manguera y riego por aspersión.



FIGURA 6: Tren de riego automático, Semillero el Plantel.

1.2.3. Siembra

Las instalaciones del semillero disponen de dos equipos de siembra automáticos con distintos cabezales, los cuales permiten utilizar todo tipo de bandejas. Siendo este equipo de siembra uno de los más eficaces en el sector de semilleros hortícolas.



FIGURA 7: Equipos de siembra.

1.2.4. Tipos de sustratos.

Los sustratos que este semillero ofrece a sus clientes son:

- Turba
- Perlita
- Fibra de coco
- Perlita
- Lana de roca

A su vez, el cliente podrá decidir el tipo de bandeja que desea para el cultivo de su planta.



FIGURA 8: Sustratos utilizados por El Plantel Semilleros.

1.2.5. Clima.

Para la consecución de un clima idóneo tanto en la germinación como en la crianza de la planta, disponen de cámaras de germinación y cultivo especiales y de sistemas de calefacción y ventilación.

2. MATERIAL VEGETAL.

La especie utilizada en este ensayo ha sido *Cucumis melo* L., el tipo de material vegetal usado fue melón tipo Piel de sapo. Se usó la variedad Ricura que se trata de una planta de vigor medio sin dificultades para el cuaje. Su fruto es oval bien conformado, algo rugoso y escriturado longitudinal. El calibre oscila entre 1,8 y 2,2 Kg durante todo el ciclo. Presenta buen comportamiento para plantaciones tardías al aire libre. (www.rijkzwaan.es, 2011.)



*FIGURA 9: Fruto de melón cv. Ricura .Fuente:
http://www.ruralcaja.org/descarga/portainj_melon.pdf*

3. MÉTODO EXPERIMENTAL.

Dicho método se puede separar en dos partes;

- La primera de análisis a las plántulas así como a los daños que presentan junto con un análisis de las semillas utilizadas para este cultivo melón Ricura. Todo el material con el que se trabajó en la investigación fue cedido por El Plantel Semilleros.
- Una segunda parte en la cual se estudiaron los resultados obtenidos del material utilizado de ensayo, así como la identificación de hongos y bacterias, realizando para dicho fin técnicas como PCR, y la utilización de kit comerciales para extraer el DNA de la bacteria resultante.

3.1. ANÁLISIS DE PLÁNTULAS Y SEMILLAS

3.1.1. Análisis de plántulas.

3.1.1.1. Selección del material vegetal.

Una vez realizada la visita al semillero para comprobar el estado de las plántulas de melón, se inició una selección al azar del material vegetal en diferentes estados fenológicos, estos estados fenológicos abarcan desde plántulas que contienen solo sus cotiledones hasta plántulas que constan con 5 a 6 hojas verdaderas, mostrando cada una de ellas diferente grado de marchitez. Las plántulas seleccionadas se encontraban en distintas localizaciones en las bandejas de soporte, tanto en el centro de las mesas, como en sus extremos, comprobando así, si existe mayor gravedad debido a la acción del riego.

Una vez seleccionadas las plantas objeto para el estudio, se agruparon en una nueva bandeja para ser trasladadas al laboratorio 2.29 de la Escuela Superior de Ingeniería.

3.1.1.2. Estudio de las plántulas.

Las muestras obtenidas del semillero, un total de 100 plántulas, fueron retiradas de la bandeja de alveolos junto con su cepellón, y extendidas sobre papel de filtro siendo estas numeradas para su posterior identificación tal y como se observan en las siguientes figuras.





FIGURA 10: Selección de las plántulas muestreadas.

Ya identificadas las plántulas se procede a la previa separación de la parte aérea de dicha plántula de su cepellón, con la ayuda de un bisturí y mediante un corte realizado en el cuello de la planta. A continuación se lava el material vegetal con agua directamente del grifo para eliminar los restos de sustrato procedente del cepellón y fertilizantes que puede contener sus hojas, y se procede anotación de datos, se tomará como dato cada uno de los daños y/o fisiopatías que presentan éstas, así como en la zona donde se localiza.



FIGURAS 11: Estudio y anotación de los daños en las plántulas.

3.1.1.3. Análisis de los daños.

Una vez anotados los daños presentes en el material vegetal, se llevó a cabo el análisis de los mismos, este método consistió en aislamientos de las zonas dañadas de la planta, así como la comparación de otros aislamientos con una planta sana. Todo ello se realizó en condiciones de esterilidad.

El método operativo fue el siguiente:

Antes de comenzar con el análisis se limpió la zona de trabajo con alcohol, a modo de desinfección, una vez limpia la zona se colocó el material necesario para llevar a cabo este proceso. Un mechero de alcohol, un frasco de alcohol, placas Petri, tijeras, bisturí, pinzas,...

Con ayuda de las pinzas y tijeras previamente desinfectadas, se efectuó la separación de las partes de interés de las plántulas, estas partes corresponden a aquellas zonas de la plántula donde se localizó los daños; tallo, cotiledones, hojas verdaderas, así

como un estudio de raíz. Los trozos cortados fueron depositados en una placa Petri en medio agar-patata-dextrosa (PDA), estas placas fueron anotadas con el número de la plántula de melón variedad Ricura, junto con la zona de donde proviene la muestra de interés. Este proceso se llevó a cabo en cada una de las muestras, desinfectando el material para cada corte, a pesar de localizarse en la misma plántula.

Al finalizar con este proceso, las placas Petri fueron selladas con Parafilm® e introducidas en la estufa durante 24 horas, para la posterior observación de los resultados.

Transcurridas 48 horas de la colocación de las placas en la estufa se procede a su estudio siendo tiempo suficiente para ver el crecimiento que se produjo de los aislamientos de las plántulas de melón, los resultados fueron anotados.

3.1.2. Análisis de semillas.

Al igual que las plántulas de melón, El Plantel Semilleros, nos cedió 100 semillas de la misma variedad correspondiente a las plántulas de estudio, variedad Ricura.

El método de análisis de estas fue el siguiente:

Se tomaron 10 placas Petri con medio agarizado (PDA), y se produjo a la división de las mismas en cuadrícula, en cada una de las divisiones se dispuso la colocación de una semilla de melón variedad Ricura, tal y como se muestra en las imágenes.

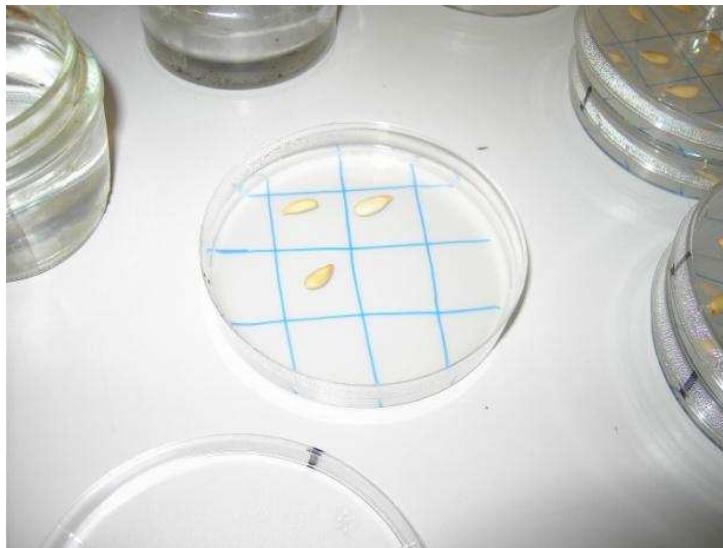


FIGURA 12: Distribución de semillas en placas.

Repitiendo el mismo proceso que para las plántulas, las placas fueron selladas con Parafilm® e introducidas en la estufa durante varios días.

Pasados 48 horas a temperatura ambiente, mostraron el siguiente aspecto, semillas pregerminadas y la aparición de colonias de hongos así como bacterias.



FIGURA 13: Semillas de melón Ricura, pasadas 48 horas a temperatura ambiente.

4. IDENTIFICACIÓN DE RESULTADOS EN PLACA.

De los aislamientos que se presentaron en el medio PDA y anteriormente mostrados, se replicaron los resultados más relevantes, evitando así contaminación. Para identificar los microorganismos presentes se realizaron los siguientes métodos.

4.1. Identificación de hongos.

Con el fin de alcanzar este objetivo, la identificación de hongos fue a través de visualización directa a través de microscopio y fueron identificados a partir de su morfología.

4.2. Identificación de bacterias.

La técnica utilizada fue la PCR basas en técnicas de biología molecular centrada en el análisis de bacterias.

Esta técnica fue llevada a cabo con la siguiente serie de pasos:

- Extracción de DNA mediante Kits comerciales.
- PCR mediante la utilización de cebadores universales que codifican para ADNr 16S (Cenis *et al.*1996)

Al finalizar este proceso se llevo a los servicios técnicos de la Universidad de Almería donde se realizó la secuenciación pertinente.

- Extracción de DNA mediante Kits comerciales.

5. EXTRACCIÓN DEL ADN SIGUIENDO EL PROTOCOLO E .Z. N. A.

El protocolo (E Z N A plant ADN kit, Omega Bio-tek) distingue diferentes métodos dentro del mismo para llevar a cabo la correcta extracción, vamos a utilizar el protocolo corto que es un método simplificado que permite la rápida visualización del ADN desde especímenes frescos, congelados o secos para el uso en reacciones PCR. El procedimiento limita la cantidad de material que se utiliza al principio, así que los resultados obtenidos con éste protocolo serán de menor calidad que los obtenidos en el protocolo A y B.

Materiales y métodos:

- Centrifugadora
- Tubos para la centrifugadora de libre enucleación
- TE precalentado a 65°
- Agua estéril
- 2- mercaptoetanol
- Etanol a 96-100%
- Isopropanol
- ARNasa de concentración 20 mg/ ml

Si partimos de tubos de microcentrífuga con colonias crecidas en medios de cultivo líquido, centrifugar 1 ó 2 minutos a 10.000 revoluciones hasta obtener el pellet.

Posteriormente eliminar el sobrenadante y quedarnos sólo con el pellet.

1. En un tubo de microcentrífuga que contiene el pellet, añadir 600µl de Buffer P1 y 40µl de Rasa. (20 mg/ml). Mezclar en el vortex e incubar a temperatura ambiente 1 minuto. Añadir 10µl de 2- mercaptoetanol y mezclar en el vortex.
2. Incubar a 65° C 5 minutos, durante la incubación realizar una mezcla mediante inversión de los tubos de micro centrífuga a la mitad del periodo de incubación.
3. Añadir 140µl de Buffer P2 y mezclar en el vortex. Centrifugar a 10.000 revoluciones durante 10 minutos.
4. Aspirar cuidadosamente 600µl del sobrenadante y colocarlo en un tubo de microcentrífuga nuevo, intentando no mezclar o aspirar el pellet o llevar algún resto.

Añadir medio volumen de Buffer P3, es decir, 300µl, y un volumen de etanol absoluto.

Mezclar hasta tener una mezcla homogénea.

Nota: puede producirse el precipitado pero no afectará el proceso.

5. Llevar 800µl de la mezcla a la columna de extracción del ADN. Ésta columna está ensamblada en un tubo de 2ml.

Centrifugar a 10.000 revoluciones durante 1 minuto para que quede sobre la columna el ADN.

Desechar el líquido que pasa a través de la columna y el tubo de microcentrífuga en el siguiente paso.

6. Añadir el resto de la muestra incluido el precipitado que se haya podido formar a la columna. Centrifugar a 10.000 revoluciones durante 1 minuto y desechar tanto el tubo de microcentrífuga como el líquido que haya pasado a través del filtro.
7. Poner la columna en un segundo tubo y añadir 750µl de Buffer de lavado diluido con etanol absoluto. Centrifugar a 10.000 revoluciones durante 1 minuto y desechar el líquido que pase a través de la columna. Mantener el tubo de 2ml.
8. Repetir el paso 7 del lavado con otros 750µl de Buffer de lavado, y centrifugar a 10.000 revoluciones durante 1 minuto. Desechar el líquido que pasa por el filtro y rehusar el tubo del paso 9.
9. Centrifugar la columna vacía durante 2 minutos al máximo de velocidad para secar, éste paso es crítico para eliminar el etanol residual que pudiera quedar en el ADN e interferir.
10. Llevarla columna a un microtubo de 1,5ml. Añadir 100µl de TE precalentado a 65° C e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 10.000 revoluciones 1 minuto.
11. Repetir el paso 10 con otros 100µl de Buffer.

5.1. Los iniciadores.

En estudios anteriores se realizó el diseño de los iniciadores. Para ello, se ha accedió a la página web (www.ncbi.nlm.nih.gov) donde aparecen secuencias ya clonadas de forma parcial o total del genoma *E. persicina*. Se seleccionaron en primer lugar secuencias de esta especie que hubieran sido empleadas para taxonomía de enterobacterias, en concreto se seleccionó la secuencia con número de ascensión AB272 647, que se corresponde con un fragmento de 719 pares de bases (pb) que codifica a heat shock protein 40 (DNAj). Estos cebadores fueron nombrados como pEW1 y pEW2 (Miñano, 2008). La secuencia de ambos cebadores es la siguiente:

pEW1: 5`GCTGTCGCTGGAAGAAGCGGTACGCGGCGT
pEW2: 5`- CGTAGCAGCGATTTCTGCTTCTCATTTCAGG- 3`

Con estos cebadores, el tamaño esperado de banda es de 660 pb.

Además, se utilizaron como control los cebadores universales que amplifican una región de 1000 pb del gen 16S RNAr; estos son:

616V: 5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'

699R: 5' - RGG GTT GCG CTC GTT -3'

Obtenidos de Invitrogen (Life Technologies).

5.2. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR.

La PCR es una técnica “in vitro”, que imita la habilidad natural de las células de ADN. Se trata de una técnica usada para replicar el ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5' > 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la Reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas: desnaturalización, apareamiento con cebadores y extensión por una ADN polimerasa termorresistente, por lo que es un método muy simple para la ampliación de ácidos nucleicos (Saiki y col., 1985; Mullis y Faloona, 1987). Como se ha dicho su fundamento es el proceso natural de la replicación del ADN, y tras cada paso, el número de células de ADN formadas es el doble de las presentes en el paso anterior. Partiendo de una molécula de “ADN diana” podremos amplificar una secuencia específica contenida en ella, mediante la utilización de unos oligonucleótidos o cebadores diseñados para éste fin.

Hasta 1980 el único método para obtener grandes cantidades de un fragmento de ADN era clonándose en vectores y multiplicándolo en bacterias.

En 1985, un investigador norteamericano, Kary Mullis, desarrollo un método que permite a partir de una pequeña muestra de ADN, obtener millones de copias de células de ADN in vitro. Esta técnica requiere conocer la secuencia de nucleótidos de los extremos del fragmento que se quiere amplificar.

La mezcla de reacción contiene:

- ✓ La secuencia de ADN que se quiere amplificar.
- ✓ Dos oligonucleótidos sintéticos que sirven de cebadores.
- ✓ Los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (ATP, GTP, CTP, TTP)

El proceso es el siguiente:

La mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización, hibridación o alineación y elongación.

- El proceso de desnaturalización: Las dos cadenas de ADN utilizadas como diana son separadas mediante la incubación a una temperatura elevada (92°-96°) dependiendo de su contenido en G+C. Las hebras disociadas permanecerán en esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la hibridación de los cebadores.

- Durante el proceso de hibridación: Los cebadores utilizados son un par de oligonucleótidos sintéticos capaces de unirse a secuencias de ADN que limitan físicamente con la región que se pretende amplificar. Cada uno de ellos es una réplica de una de las cadenas del ADN y su diseño es tal que quedan enfrentados por sus extremos 3' tras la unión a la molécula de "ADN diana". La distancia entre ellos en el conjunto ADN-cebadores determinará la longitud de la secuencia de ADN amplificada.

- Durante el proceso de elongación: El tercer paso consiste en la elongación de los cebadores por la acción de la ADN polimerasa. Las condiciones en las cuales se desarrolla depende directamente del tipo de ADN polimerasa utilizado. El resultado del proceso es la formación de unas cadenas de ADN copiadas de las moléculas diana y que han incorporado en el extremo 5' de su secuencia la del respectivo cebador. En la elongación de los cebadores interviene una ADN polimerasa purificada a partir de un microorganismo termófilo, *Thermus aquaticus*. (Saiki y col 1988).

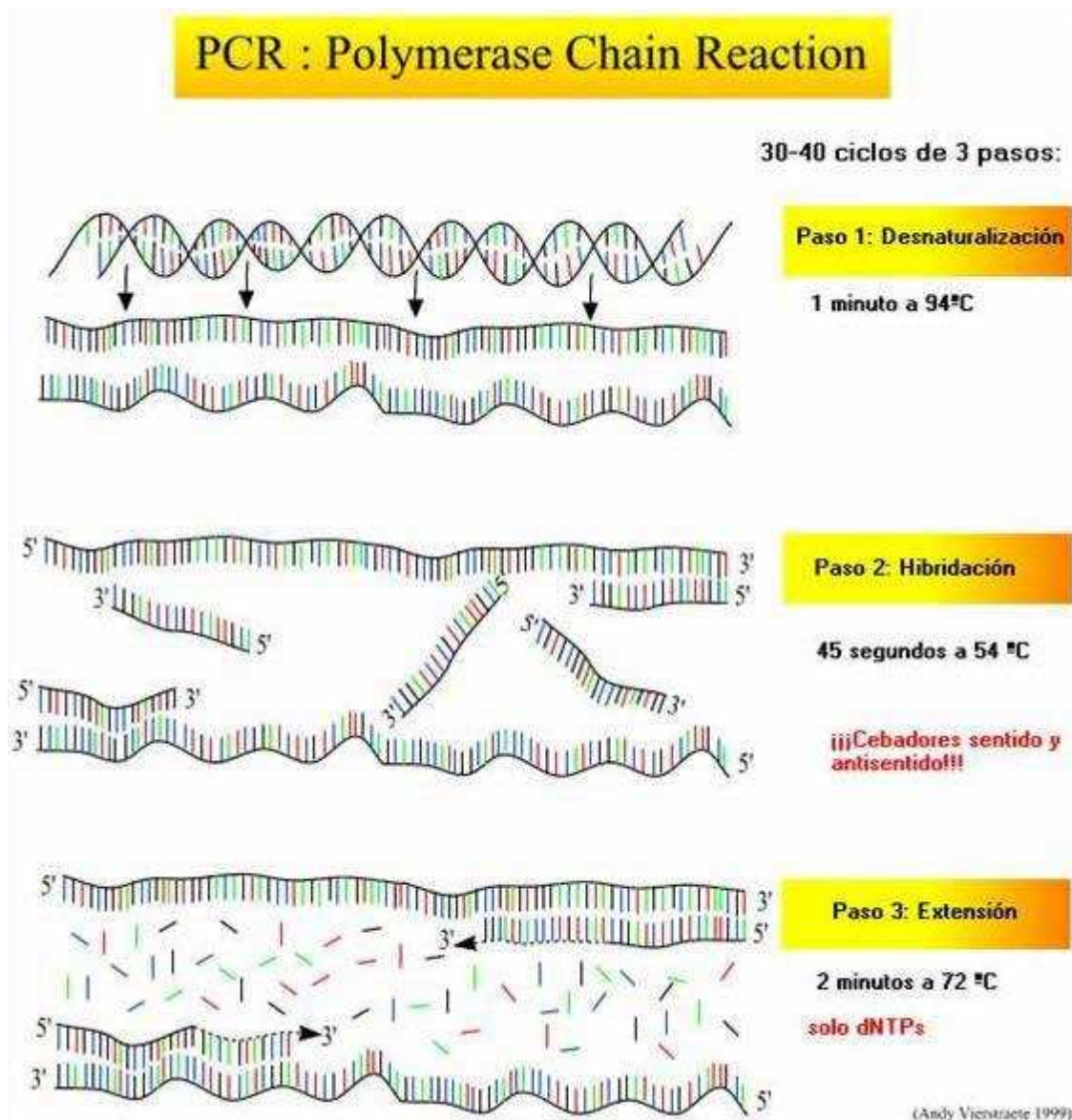


FIGURA 14: Pasos básicos de la PCR (de Andy Vierstraete 1999)

En la técnica de reacción en cadena de la ADN polimerasa cada conjunto de estos tres pasos (desnaturalización, hibridación y elongación) constituye un ciclo. A partir del tercer ciclo se empieza a acumular el producto de interés, delimitado por los extremos 5' de los cebadores. A medida que aumenta el número de ciclos, este producto pasa a ser la molécula diana a la cual se unirán preferentemente las moléculas de cebador presente en la mezcla, conduciendo a una acumulación teóricamente exponencial del producto.

En la mezcla también se obtienen otros “productos largos”, una de cuyas cadenas deriva de las moléculas originales diana.

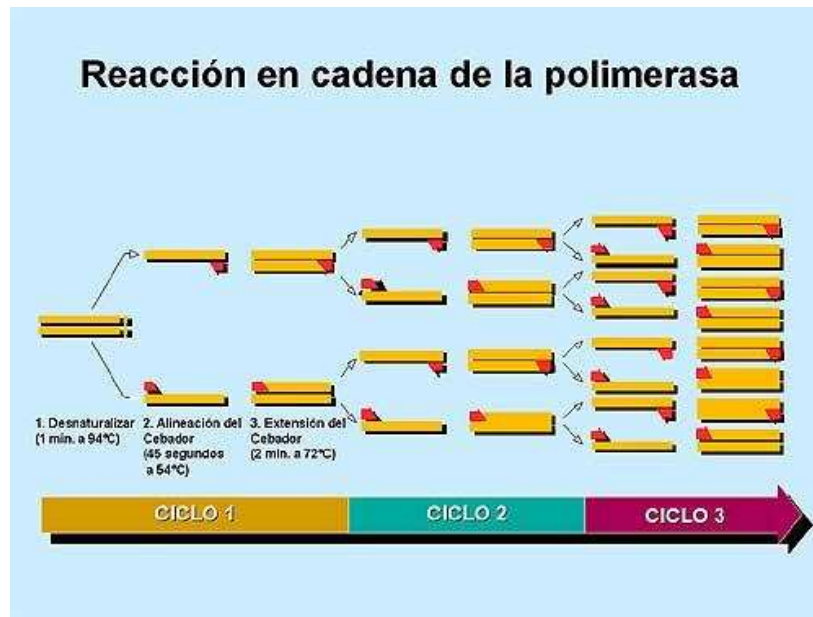


FIGURA 15: Amplificación exponencial del PCR

La detección del producto obtenido en la PCR se utiliza mediante electroforesis en gel de agarosa, siguiendo el método descrito por Sambrook y col, (1989). Se utilizó agarosa dependiendo del tamaño de la ampliación y la resolución que deseemos utilizaremos diferentes medios a diferentes concentraciones, como se muestra en el siguiente apartado.

La posterior visualización se realizó tiñéndolo con una solución de bromuro de etidio en agua destilada. El bromuro de etidio es un agente intercalante que se une a la doble hélice de ADN y produce una luz anaranjada cuando el gel se ilumina con ultravioleta.

Actualmente la polimerasa que se utiliza para la PCR es la Taq polimerasa, porque ha simplificado enormemente la técnica, ya que ha permitido su automatización.

El protocolo que nosotros hemos seguido para la realización de la PCR es el siguiente:

1) En una base de hielo picado se colocó una gradilla para tubos de PCR de 0,25 ml. Tras su etiquetado se añade a cada uno de ellos 5 µl de ADN, muestras que previamente se han obtenido llevando a cabo el protocolo corto E. Z. N. A. y que fueron conservados en el congelador.

2) La composición de la reacción (Premix) se indica a continuación en la tabla 2. Lógicamente, se utilizan los cebadores correspondientes para cada reacción (Serie 1: cebadores universales; Serie 2: cebadores diseñados correspondientes a la zona DNAj, especificados en el apartado de resultados y discusión.

SERIE 1	SERIE 2
5µl de tampón	5µl de tampón
2,5µl de oligo 1,pA	2,5µl de oligo 2,EW1
2,5µl de oligo 1,pH	2,5µl de oligo 1,EW2
0,25µl taq-polimerasa	0,25µl taq-polimerasa
1µl DNTs	1µl DNTs
2µl Mg	2µl Mg
31,75µl de agua pura	31,75µl de agua pura

CUADRO 5: Reactivos para la reacción de PCR

3. La aplicación de la Taq polimerasa al premix se realiza al final para evitar el comienzo de la actividad de la misma.

4. Finalmente se añaden 45 µl de premix a cada tubo obteniendo un volumen final de 50 µl. Se colocan los tubos en el termociclador con las condiciones de PCR ya programadas.

Las mezclas de las reacciones (premix) se multiplican según el número de reacciones a realizar, preparando 1 ó 2 reacciones de más por fallos en el pipeteo.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Paso 0) 94° C durante 4 minutos

Paso 1) 94° C durante 1 minuto

Paso 2) 72° C durante 2 minutos.

Paso 3) volver al paso 2^a, 34 veces.

Paso 4) 72° C durante 10 minutos.

Paso 5) 10° C infinito.

Para la optimización de las condiciones, se realizaron cambios en los tiempos del paso 2 y en el número de ciclos.



FIGURA 16: Termociclador usado en el presente PFC.



FIGURA 17: Termociclador donde podemos observar las diferentes partes para su programación y posterior funcionamiento.

5.3. Electroforesis de los productos de la PCR.

La electroforesis en general permite la separación de moléculas como consecuencia de su diferente movilidad en un campo eléctrico. Por lo tanto el parámetro esencial es la diferente carga eléctrica de las moléculas. La carga depende del pH del medio, en el gel de agarosa, que es el medio que tenemos se observa un gran avance de las moléculas, por lo que la movilidad dependerá mucho del tamaño de las moléculas.

La agarosa es un polisacárido, cuyas disoluciones poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de los 50° C y formar un gel, semisólido, al enfriarse. Éste gel está formado por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas, embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas de ácido nucleico a su través, en mayor medida cuanto más grandes sean éstas.

Dado que la fuerza impulsora es proporcional a la carga eléctrica, el parámetro que rige el avance es la relación carga/masa. Para un ácido nucleico la carga eléctrica es proporcional a la longitud de nucleótidos, por lo que la relación q/m es la misma para todas sus moléculas. Sin embargo el efecto del retardo debido al gel depende del tamaño molecular. Como resultado neto la electroforesis separa los fragmentos de ácido nucleico según su tamaño o longitud, expresado en nucleótidos, si son de hebra sencilla, o en pares de bases si son de doble hebra, caso del ADN. Por ello se puede establecer una curva de calibrado que relacione la movilidad con la longitud en pares de bases (pb).

Concentración de agarosa	Tamaño de los fragmento de ADN separados
0,3 %	5-60 KB
0,5 %	1-30 KB
0,7 %	0,8-12 KB
1,0 %	0,5- 10 KB
1,2 %	0,4- 7 KB
1,5 %	0,2-3 KB
2,0 %	0,05-2 KB

CUADRO 6: Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de los distintos tamaños de fragmentos de ADN.

Una vez acabada la técnica de la PCR, se conservan los productos en tubos de microcentrífuga en el frigorífico, y se prepara el gel de agarosa, para el cual se ponen 100ml de TBE 10x y lo diluiremos con agua destilada hasta completar 1 l de ésta disolución, posteriormente en un vaso de precipitado se homogeniza 100ml de ésta solución con 0,80g de agarosa, (aunque tendremos en cuenta que la concentración de agarosa va depender de los pares de bases que tengamos) y calentamos en el microondas hasta que la mezcla quede translúcida.

Se limpian bien las placas de metacrilato se sellan los bordes y ponemos el gel de agarosa, le colocamos el peine para hacer los pocillos en los cuales suspenderemos las muestras.

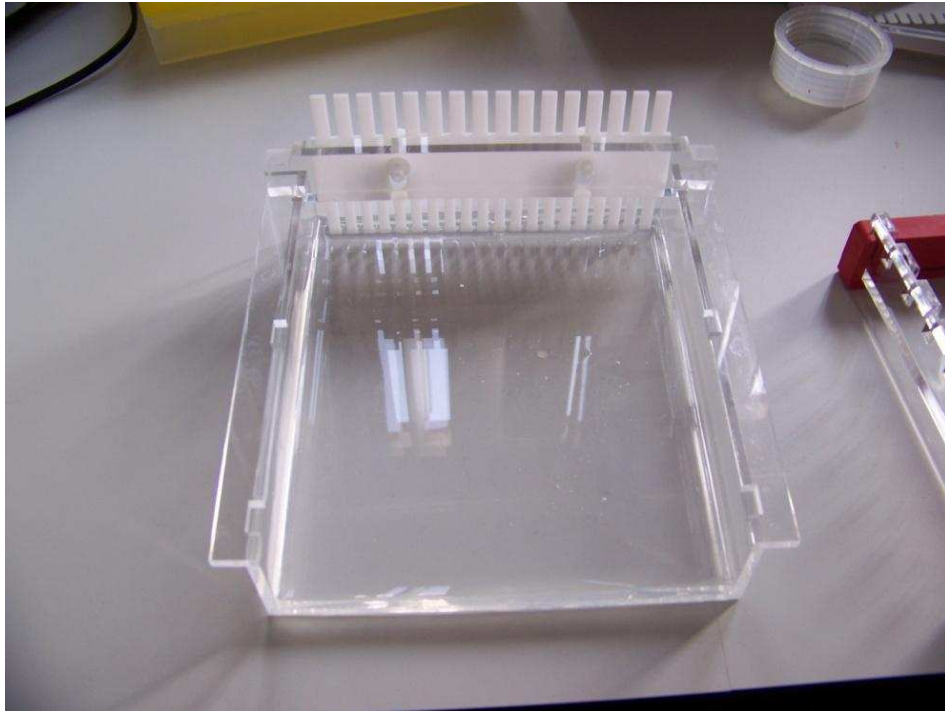


FIGURA 18: Placas de metacrilato, con el peine para hacer los pocillos.



FIGURA 19: Gel de agarosa líquido, al disminuir la temperatura solidificará.

En cada pocillo depositaremos una solución que contiene 10 μ l de su muestra correspondiente, más 3 μ l de colorante, mezclada previamente.

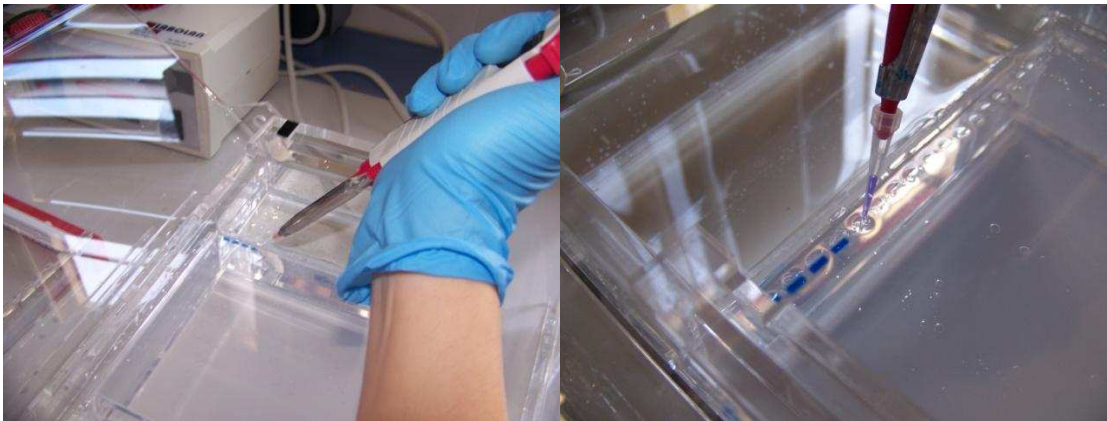


FIGURA 20. Carga del gel de agarosa, y detalle de la carga.

Una vez cargado el gel se corren los productos, para ello, se conecta a una fuente de alimentación aproximadamente a 50mA, (aunque la intensidad dependerá de la concentración del gel de agarosa empleada) durante 30 min.

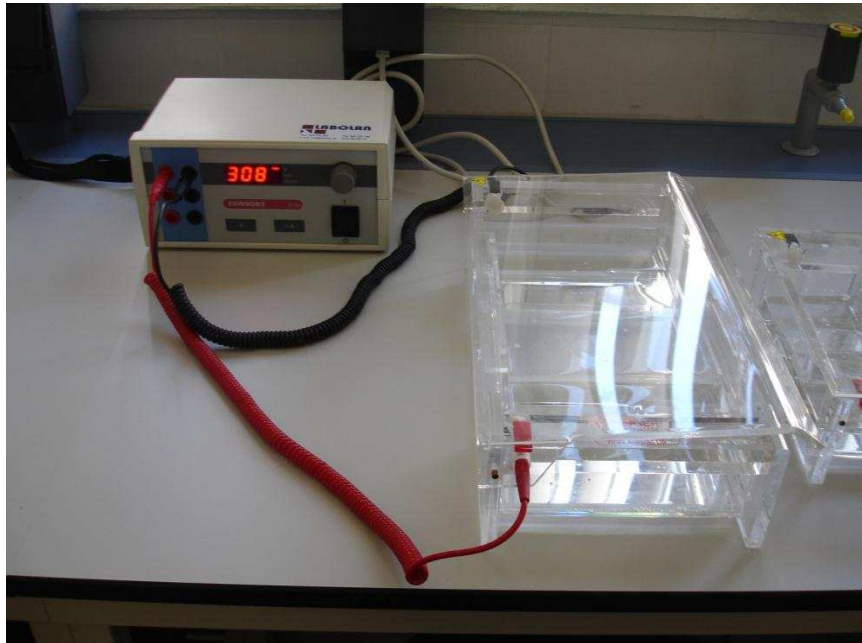


FIGURA 21. Fuente de alimentación conectada al gel.

Finalmente se suspende el gel en una solución de bromuro de etidio, lo dejamos que se tiña y se observa con lámpara ultravioleta, como se indicó anteriormente.

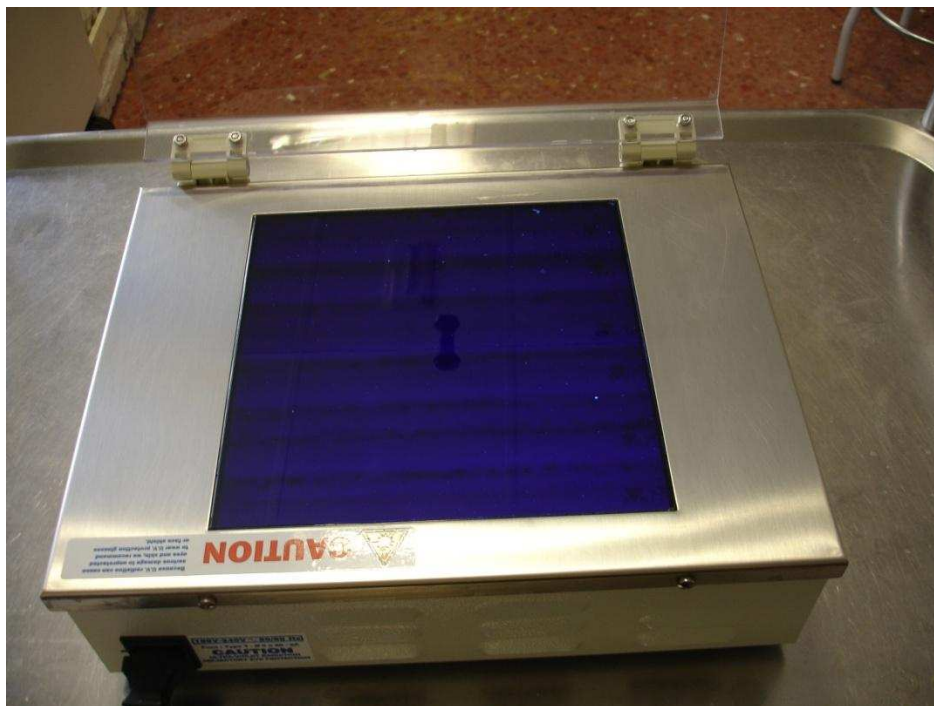


FIGURA 22. Lámpara de luz ultravioleta para la visualización de geles.

El gel teñido se fotografió para su posterior análisis.

6. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR.

El kit de purificación de fragmento de PCR empleado es Jet quick Spin Column Technique, (Genomed GMBH). El protocolo es el siguiente:

1. Mezclamos todas las muestras de ADN que sean iguales, es decir que provengan del mismo aislado.
2. Le añadimos 400µl de H1, procedente del kits, y lo volteo.
3. Lo paso a las columnas y centrifugo durante 1 minuto a 12.000 revoluciones.
4. Elimino el sobrenadante que me queda en el tubo, y se añaden 500µl de H2, centrifugo durante 1 minuto a 12.000 revoluciones, y de nuevo se desecha el sobrenadante.
5. Se centrifuga de nuevo con la columna vacía, con el objetivo de secar.
6. Se ponen las columnas sobre tubos de microcentrífuga limpios, y se le añade 50µl de agua destilada estéril, previamente calentada a unos 65° C, y se vuelve a centrifugar durante 1 minuto a 12.000 revoluciones.
7. Se eliminan las columnas, y ya he obtenido el ADN purificado, el cual conservaré en lo tubos de microcentrífuga, para posteriormente enviarlos a secuenciar.

7. MEDIOS DE CULTIVO.

En este trabajo se han utilizado diferentes medios de cultivo, con el fin de constituir un medio adecuado para el desarrollo de los hongos.

Los medios utilizados se prepararon en una botella de vidrio para autoclave, a la cual se le adicionaron los componentes de cada medio.

Una vez que se cerró la botella y se agitó para homogenizar su contenido, se introdujo en un autoclave con una potencia de 3500 W, donde permaneció a 121 °C durante 20 minutos.

Una vez que se esterilizó el medio, se dejó enfriar hasta que alcanzó una temperatura próxima a 50°C, en este momento se comenzó el vertido de 15 ml de éste por placa Petri de 9 cm de diámetro mediante dos formas, gracias a un dosificador previamente esterilizado, o manualmente. Ambos procesos se realizaron en un medio aséptico evitando así posibles contaminaciones.

7.1. Medio Caldo Nutritivo (CN).

Este medio es un preparado comercial y se ha utilizado para hacer crecer a las bacterias resultantes en el primer ensayo, localizadas en un medio de cultivo PDA.

Su composición es:

- Caldo Nutritivo (CN).....8g
- Agua destilada1000ml

En la balanza y sobre una hoja se pesan los 8 g de preparado comercial del Caldo Nutritivo, se adicionan al frasco de vidrio especial para autoclave y se le añaden 1000ml de agua destilada hasta su enrase.

7.2. Medio agar-patata-dextrosa (PDA)

Se ha sido utilizado para el análisis de las plántulas en el laboratorio, ya que sobre este medio se desarrollan muy bien los géneros fúngicos y las bacterias.

Su composición es:

- Agar15g
- Patata.....200g
- Glucosa/Dextrosa.....20g
- Agua destilada.....1000ml

Se hierven los 200g de patata en 800ml de agua destilada durante 1 hora, después se filtra a través de muselina. Al filtrarlo se le añade el agar y la dextrosa y se enrasa hasta 1000ml. Se esteriliza en el autoclave durante 20 min. A 121 °C

7.3. Medio de cultivo Triptona- Sacarosa- Agar.(TSA)

Es un preparado comercial compuesto por Triptona, Sacarosa y Agar. Utilizado al igual que el medio de cultivo PDA para el análisis de las plántulas en el laboratorio, desarrollándose en él correctamente los géneros fúngicos y las bacterias.

8. ANÁLISIS MOLECULAR.

Los componentes necesarios para llevar a cabo el análisis molecular son los siguientes:

8.1. Ordenación del ADN de las muestras estudiadas.

Una vez obtenido la secuenciación de las muestras, los datos son llevados al programa Chromas Pro 1.5. cuya función es completar las cadenas de ADN de posibles errores y poderlas exportar posteriormente a la plataforma NCBI, la cual nos proporcionará los posibles resultados, dependiendo del tipo de muestra que se utilice en ese momento.

II. RESULTADOS Y DISCUSIONES:

1. IDENTIFICACIÓN DE RESULTADOS.

1.1. Método de análisis para los resultados obtenidos en el análisis de las plántulas.

Como se puede observar en las siguientes figuras, las placas al transcurrir 48 horas en el a temperatura ambiente presentaron el siguiente aspecto,

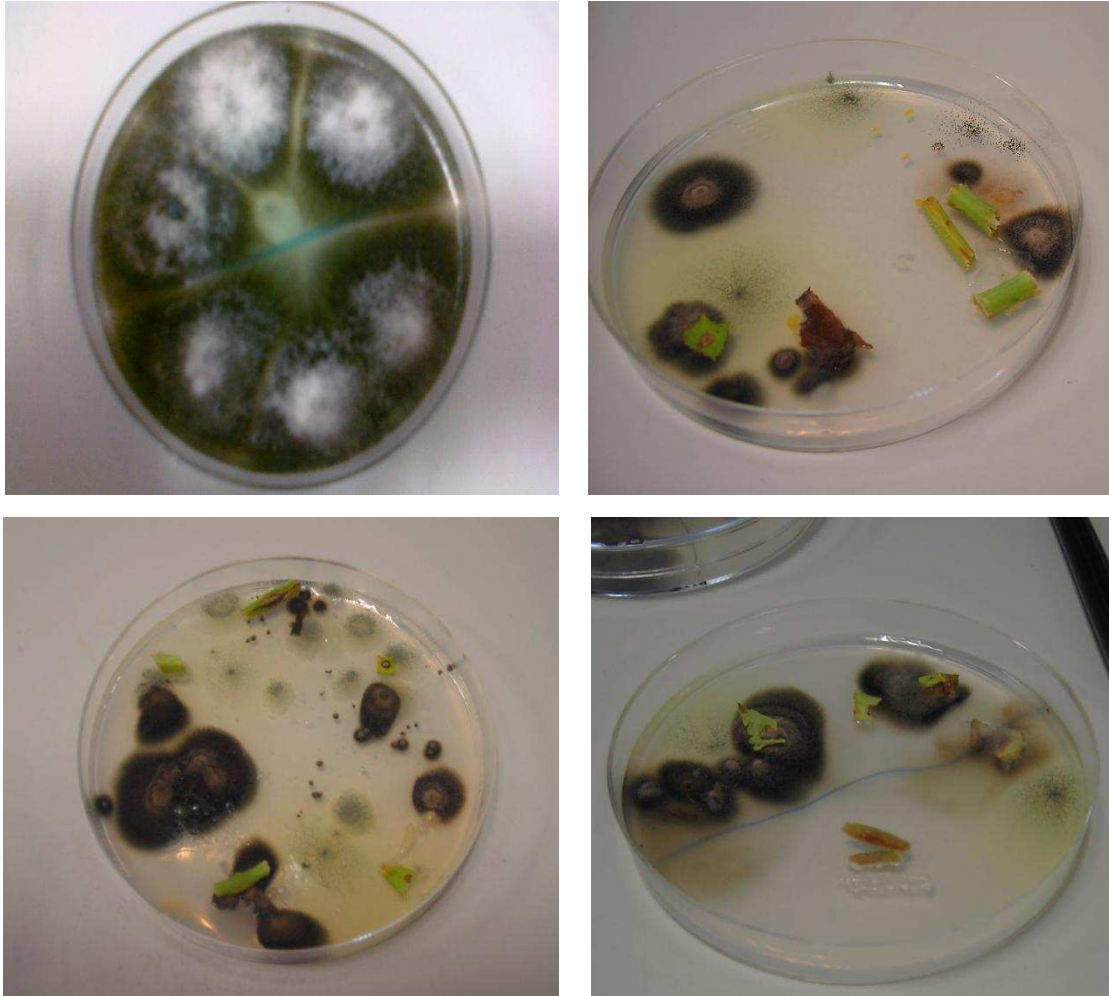


Figura 23: Resultado de las placas con las muestras de plántulas, pasado 48 horas en estufa.

1.2. Resultados obtenidos en placas.

Los cuadros que se muestran a continuación corresponden a la recogida de datos, según los resultados obtenidos en las placas de muestreo, donde se llevo a cabo el análisis, tanto de las plántulas de melón, variedad Ricura, como de las semillas correspondientes a la misma variedad.

1.2.1. Resultados del análisis de plántulas.

NOMBRE DE LA PLANTA (Código placa).	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
PLANTA M30	P1	Cotiledones: de color amarillo. Hojas: manchas necróticas Tallo: no presenta lesiones	Hojas: - <i>Cladosporium</i> . - Bacteria. Tallo: - Bacteria. - hongo: <i>Aspergillus</i> .
PLANTA M29	P2	Hojas: Lesiones necróticas. Tallo: rajado en la zona del cotiledón y en el 1er nudo (2 lesiones)	Hojas: - <i>Cladosporium</i> . Tallo: - <i>Cladosporium</i> .
PLANTA M31	P3	Cotiledones: amarillos	Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
PLANTA M32	P4	Tallos: pudrición en el cuello desde la base hasta el cotiledón. (vasos limpios) Cotiledones: amarillos	Tallo: - <i>Trichoderma sp.</i> Hojas: - Bacteria.
PLANTA M33	P5	Tallos: cuello podrido Cotiledones: amarillos	Tallo: - Presencia de <i>Pythium aphanidermatum</i> .
PLANTA M34	P6	Cotiledones: manchas aceitosas	Cotiledones: - Bacteria
PLANTA M35	P7	Cotiledones: amarillos Tallo: lesión en el 1er nudo. Hojas: lesión necrótica	Tallo: - Bacteria Hojas: - Bacteria

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (nº)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
PLANTA M36	P8	<p><u>Cotiledones</u>: amarillo <u>Tallo</u>: rajado entre el cotiledón y el 1er nudo. Vaso central necrosado <u>Hojas</u>: manchas necróticas.</p>	<p>Tallo: - bacteria Hojas: - hongo.</p>
PLANTA M37	P9	<p><u>Cotiledones</u>: amarillo. <u>Tallo</u>: rajado en el 3er nudo. <u>Hojas</u>: mancha necrótica</p>	<p>Tallos: - <i>Pythium aphanidermatum</i>. - Flameado: Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i>.</p>
PLANTA M38	P10	<p><u>Cotiledones</u>: amarillo. <u>Tallo</u>: podrido desde la raíz hasta el cotiledón.</p>	<p>Phoma cucurbitacearum (<i>Didymella Bryoniae</i>)</p>
PLANTA M39	P11	<p><u>Cotiledones</u>: Amarillo <u>Tallo</u>: rajado hasta el cotiledón. <u>Hojas</u>: manchas necróticas.</p>	<p>Tallo: - Flameado: Bacteria. T. - sin flamear: <i>Cladosporium</i>. Hojas: - Cladosp.</p>
PLANTA M40	P12	<p><u>Tallo</u>: lesión necrótica 1er nudo.</p>	<p>Tallo: - <i>Cladosporium</i>.</p>
PLANTA M41	P13	<p><u>Tallo</u>: rajado, lesión necrótica desde cotiledón hasta 1er nudo. <u>Hojas</u>: lesiones muy marcadas.</p>	<p>Tallo: - <i>Cladosporium</i>.</p>
PLANTA M42	P14	<p>Planta muerta con tallo podrido, no tiene hoja</p>	<p>Phoma cucurbitacearum (<i>Didymella Bryoniae</i>)</p>

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (n°)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
Amalia planta 2	P16	<u>Tallos</u> :rajados <u>Hojas</u> : con puntos necróticos	Tallo: - Rajado: hongo. - Rajado (flameado): Bacteria. - cerca de la base: Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Amalia planta 1	P15	<u>Hojas</u> : con manchas aceitosas y punto necróticos.	Hojas: - <i>Cladosporium</i>
Amalia Planta 3	P17	<u>Tallo</u> : rajado en la altura de los cotiledones. <u>Hojas</u> : borde quemado y contorno amarillo, pedúnculos rajados, y puntos necróticos.	Tallo: - Rajado (flameado): bacteria. Hojas: - Flameado: Bacteria. - Puntos necróticos: hongo y bacteria.
Amalia Planta 4	P18	<u>Tallo</u> : Daños en el cuello de la planta. <u>Hojas</u> : Puntos necróticos	Tallo: - Herida en cuello: hongo y bacteria. - Herida flameada: bacteria. Hojas: - Puntos necróticos: <i>Cladosporium</i> . Raíz: Bacteria.
Amalia planta 5	P19	<u>Tallo</u> : heridas en peciolo. <u>Hojas</u> : puntos necróticos.	Tallo: - Herida tallo altura cotiledones: Hongo - Herida peciolo flameado: Hongo y Bacteria.

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (nº)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
Amalia planta 6	P20	<p><u>Tallo</u>: daño en el cuello bajo cotiledones, mancha marrón y herida.</p> <p><u>Hojas</u>: mancha aceitosa.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Herida: Bacteria. - Pedúnculo <i>Cladosporium</i> <p>Hoja:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mancha aceitosa: Bacteria. - Mancha aceitosa (flameada): Bacteria.
Amalia planta 7	P21	<p><u>Tallo</u>: daño en el cuello altura cotiledones, mancha marrón y herida.</p> <p><u>Hojas</u>: puntos necróticos.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Daño cuello: <i>Cladosporium</i> y Bacteria. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Punto necróticos: hongo <p>Raíz: Bacteria</p>
Amalia planta 8	P22	<p><u>Hojas</u>: puntos necróticos.</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i> - Bacteria.
Amalia planta 9	P23	<p><u>Hojas</u>: puntos necróticos</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria (sin flamear) - Hongo. <p>Tallo: Bacteria.</p>
Amalia planta 10	P24	<p><u>Hojas</u>: puntos necróticos</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i> - Bacteria. <p>Tallo(sin flamear):</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria.
Isa planta 1	P25	<p><u>Tallos</u>: Rajado.</p> <p><u>Hojas</u>: necróticas.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>. <p>Hoja:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
Isa Planta 2	P26	<p><u>Hojas</u>: Necrótica</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
Isa Planta 3	P27	<p><u>Tallo</u> totalmente marrón.</p> <p><u>Hojas</u>: necróticas.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (n°)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
Isa Planta 4	P28	Análisis de sustrato	Sustrato: - Nematodos.
Isa planta 5	P29	<u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: <i>Cladosporium</i> .
Isa Planta 6	P30	<u>Tallo</u> : rajado. <u>Hojas</u> : necróticas	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 7	P31	<u>Tallos</u> necrosado. <u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hoja: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 8	P32	<u>Tallo</u> : necrosado. <u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo(flameado):: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 9	P33	<u>Tallos</u> : mancha negra. <u>Hojas</u> : negras más de la mitad.	Tallo flameado. Hojas: - Hongo. - Bacteria.
Isa planta 10	P34	<u>Tallo</u> : necrosado. <u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 11	P35	<u>Tallo</u> : cuello podrido. <u>Hoja</u> : necrótica.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 12	P36	<u>Tallo</u> : Rajado. <u>Hojas</u> necróticas	Tallo: - Bacteria. Hoja: - Bacteria.
Isa planta 13	P37	<u>Tallo</u> : podrido. <u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 14	P38	<u>Tallos</u> : podridos. <u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (n°)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
Al #1	P39	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Al #2	P40	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Al #3	P41	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria.
Al #4	P42	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Al #5	P43	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hoja: - <i>Cladosporium</i> .
Al #6	P44	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas	Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria.
Al #7	P45	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hoja:</u> necrótica.	Tallo: - Bacteria.
Al #8	P46	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas	Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria.
Al #9	P47	<u>Tallo:</u> Daños en el cuello de la planta. <u>Hojas:</u> negras más de la mitad.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria.
P1	P48	<u>Hojas:</u> Manchas aceitosas y necróticas. <u>Cotiledones:</u> Decoloración	Hojas: - Hongo.
P2	P49	<u>Tallo:</u> rajado del tallo(3 ^{er} entrenudo). <u>Hojas:</u> borde quemado, puntos necróticos.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hojas: - <i>Cladosporium</i> .

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (n°)	SINTOMATOLOGÍA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
P3	P50	<p><u>Tallo:</u> estrechamiento y pudrición en la base del tallo.</p> <p><u>Hojas:</u> manchas aceitosas en la base.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Pythium aphanidermatum</i>. <p>Cotiledón:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Pythium aphanidermatum</i>.
P4	P51	<p><u>Tallo:</u> Estrechamiento en la base.</p> <p><u>Cotiledones:</u> manchas aceitosas, marchitados.</p> <p><u>Hojas:</u> manchas cloróticas.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
P5	P52	<p><u>Tallo:</u> estrechamiento en la base.</p> <p><u>Hojas:</u> mancha aceitosas.</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
P6	P53	<p><u>Tallo:</u> Rajado en el 2º y 3º entrenudo (2 lesiones)</p> <p><u>Hojas:</u> puntos necróticos.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i> <p>Hoja:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
P7	P54	<p><u>Tallo:</u> estrechamiento en su base.</p> <p><u>Hojas:</u> necróticas.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
P8	P55	<p><u>Tallo:</u> podredumbre en la base.</p> <p><u>Hojas:</u> manchas aceitosas.</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria.
P9	P56	<p><u>Tallo:</u> estrechamiento en el tallo.</p> <p><u>Hojas:</u> amarilleamiento en el borde, puntos necróticos.</p> <p><u>Cotiledones:</u> manchas aceitosas.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hongo: <i>Pythium</i>. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria. - <i>Cladosporium</i>. <p>Cotiledones:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria. - <i>Cladosporium</i>.
P10	P57	<p><u>Tallo:</u> Rajado 3er entrenudo.</p> <p><u>Hojas:</u> punteado necrótico.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (n°)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
P11	P58	<p><u>Tallo</u>: rajado 3er entrenudo. <u>Hojas</u>: punteado necrótico. <u>Cotiledones</u>: marchitez en el borde.</p>	<p>Tallo: - <i>Cladosporium</i>. Cotiledón: - Bacteria. - <i>Cladosporium</i>.</p>
P12	P59	<p><u>Tallo</u>: estrechamiento en su base. <u>Hojas</u>: puntos necróticos</p>	<p>Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria.</p>
P13	P60	<p><u>Tallo</u>: Rajado 1er entrenudo. <u>Cotiledones</u>: marchitez en el borde. <u>Hojas</u>: borde marchito.</p>	<p>Tallo: - Bacteria. - <i>Cladosporium</i>. Cotiledón: - Bacteria - <i>Cladosporium</i>.</p>
P14	P61	<p><u>Tallo</u>: Estrechamiento en su base. <u>Hojas</u>: marchitez en el borde.</p>	<p>Tallo: - Bacteria.</p>
P15	P62	<p><u>Tallo</u>: pudrición en el cuello. <u>Cotiledones</u>: manchas aceitosas. <u>Hojas</u>: manchas necróticas.</p>	<p>Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria. Raíz: - <i>Rhizoctonia</i>.</p>
P16	P63	<p><u>Cotiledones</u>: Manchas aceitosas. <u>Hojas</u>: Manchas necróticas.</p>	<p>Hojas: - <i>Cladosporium</i></p>
P17	P64	<p><u>Tallo</u>: Podrido desde la base hasta el 1er entrenudo. <u>Hojas</u>: Manchas necróticas.</p>	<p>Tallo: - Bacteria.</p>
P18	P65	<p><u>Tallo</u>: Podrido desde la base hasta cotiledones. <u>Hojas</u>: Manchas aceitosas.</p>	<p>Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria. - <i>Cladosporium</i>.</p>

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (nº)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
P19	P66	<u>Tallo:</u> podrido en la base del cuello, rajado en el 1er entrenudo. <u>Hojas:</u> Manchas necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i>
P20	P67	<u>Tallo:</u> Rajado 1 ^{er} al 2º entrenudo. <u>Hojas:</u> Manchas necróticas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
P21	P68	<u>Tallo:</u> Pudrición. <u>Hojas:</u> Manchas aceitosas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hojas: - Bacteria. - <i>Cladosporium</i> .
P22	P69	<u>Tallo:</u> rajado 2 lesiones. <u>Hojas:</u> aceitosas, puntos necróticos.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> Hojas: - <i>Cladosporium</i> . - Bacteria.
P23	P70	<u>Tallo:</u> Podredumbre en la base. <u>Cotiledones:</u> Manchas aceitosas.	Tallo: - Bacteria. Cotiledones: - Bacteria.
P24	P71	<u>Tallo:</u> Podredumbre en la base. <u>Hojas:</u> Manchas necróticas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
P36	P72	<u>Tallo:</u> Rajado múltiple 4 lesiones <u>Hojas:</u> manchas aceitosas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> Hojas: - <i>Cladosporium</i> . - Bacteria.

CUADRO 7: Resultados registrados en las placas procedentes del análisis de plántulas de melón.

1.2.2. Muestreo en semillas.

Los resultados que se obtuvieron en el análisis de semillas sobre medio de cultivo agarizado, fueron los que se muestran a continuación en el cuadro 8.

NÚMERO DE PLACA.	TOTAL DE SEMILLAS POR PLACA	RESULTADOS OBTENIDOS	
		HONGOS	Nº BACTERIA
1	10	5- <i>Aspergillus</i> 1- <i>Aspergillus</i> 4- <i>Penicillium</i>	2
2	10	3- <i>Aspergillus</i>	8
3	10	1- <i>Aspergillus</i> 1- <i>Aspergillus</i>	6
4	10	2- <i>Aspergillus</i>	6
5	10	3- <i>Aspergillus</i> 1- <i>Penicillium</i>	2
6	10	4- <i>Aspergillus</i>	3
7	10	1- <i>Aspergillus</i>	5
8	10	2- <i>Penicillium</i> 3- <i>Aspergillus</i>	3
9	10	<i>Penicillium</i>	4
10	10	2- <i>Aspergillus</i> .	2
TOTAL SEMILLAS		TOTAL BACTERIAS	
100		41	

CUADRO 8: resultados registrados en Placa Petri procedentes del análisis de semillas.

Con este resultado se observa, que de las 100 semillas analizadas, aparecieron un total de 41 bacterias.

2. LA ELECTROFORESIS RESULTADOS DE LA PCR.

Pasado el tiempo de tinción del gel con bromuro de etidio, y su posterior visión en la lámpara ultravioleta, se observaron los resultados que se muestran en la Figura 24.

En la figura se observa el fragmento de 1500pb correspondiente a la zona del genómico del ADNr 16S, de los distintos aislados analizados.

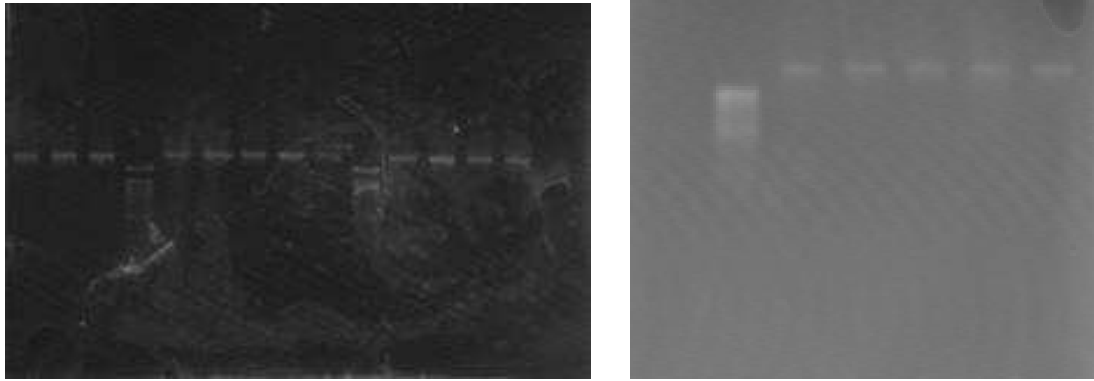


FIGURA 24: Resultados obtenidos de la tinción del gel, visto en la lámpara ultravioleta.

En cada uno de los pocillos se observa la banda de 1500pb correspondientes al ADNr 16 s de los distintos aislados encontrados en las semillas y plantas.

3. ANÁLISIS MOLECULAR.

Tras realizar el análisis molecular a las muestras bacterianas; 5, 6, 7 y 10 correspondiendo la muestra 5 a bacterias procedentes directamente de semillas y el resto siendo bacterias procedentes de material vegetal de las plántulas de melón y una vez hecha la purificación de fragmentos de PCR se obtuvieron los siguientes resultados.

3.1. Análisis molecular para la muestra 5.

Para la muestra 5 procedente de las bacterias localizadas de semilla de melón variedad Ricura, y una vez reordenada la secuenciación a través de programa Chroma Pro 1.5. y su posterior exportación al NCBI se obtuvo como resultado el cuadro 9 donde aparecen las bacterias con una gran similitud con nuestra bacteria muestra.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ905063.1	Uncultured bacterium clone THBP.0912.107 16S ribosomal RNA gene,	955	955	99%	0.0	95%
EU467917.1	Uncultured bacterium clone CE2_a08 16S ribosomal RNA gene, partia	955	955	99%	0.0	95%
EF204216.1	Delftia sp. H214 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
EF204215.1	Delftia sp. H213 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
EF204214.1	Delftia sp. H212 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
EF204213.1	Delftia sp. H209 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
EF204212.1	Delftia sp. H208 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
AF532869.1	Comamonas sp. D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
HM273525.1	Uncultured bacterium clone ncd517e05c1 16S ribosomal RNA gene, p	950	950	99%	0.0	94%
EF565937.1	Comamonas sp. NF27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	924	924	99%	0.0	94%
JM128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	917	917	99%	0.0	93%
HM298901.1	Uncultured bacterium clone ncd902f09c1 16S ribosomal RNA gene, p	917	917	99%	0.0	93%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial se	913	913	99%	0.0	93%
FJ946520.1	Uncultured Comamonas sp. clone LSS-E5 16S ribosomal RNA gene, p	911	911	99%	0.0	93%
AJ350282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene, isolate TK41	911	911	99%	0.0	93%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	907	907	99%	0.0	93%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	902	902	99%	0.0	93%
JF690938.1	Comamonas sp. MZ_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	99%	0.0	93%
EF565937.1	Comamonas sp. NF27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	924	924	99%	0.0	94%
JM128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	917	917	99%	0.0	93%
HM298901.1	Uncultured bacterium clone ncd902f09c1 16S ribosomal RNA gene, p	917	917	99%	0.0	93%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial se	913	913	99%	0.0	93%
FJ946520.1	Uncultured Comamonas sp. clone LSS-E5 16S ribosomal RNA gene, p	911	911	99%	0.0	93%
AJ350282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene, isolate TK41	911	911	99%	0.0	93%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	907	907	99%	0.0	93%
EF565937.1	Comamonas sp. NF27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	924	924	99%	0.0	94%
JM128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	917	917	99%	0.0	93%
HM298901.1	Uncultured bacterium clone ncd902f09c1 16S ribosomal RNA gene, p	917	917	99%	0.0	93%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial se	913	913	99%	0.0	93%
FJ946520.1	Uncultured Comamonas sp. clone LSS-E5 16S ribosomal RNA gene, p	911	911	99%	0.0	93%
AJ350282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene, isolate TK41	911	911	99%	0.0	93%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	907	907	99%	0.0	93%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	902	902	99%	0.0	93%
JF690938.1	Comamonas sp. MZ_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	99%	0.0	93%
JF218140.1	Uncultured bacterium clone ncd2540d08c1 16S ribosomal RNA gene,	889	889	99%	0.0	93%
JF209871.1	Uncultured bacterium clone ncd2414d11c1 16S ribosomal RNA gene,	889	889	99%	0.0	93%
JF200954.1	Uncultured bacterium clone ncd2413g04c1 16S ribosomal RNA gene,	889	889	99%	0.0	93%
HM365953.1	Comamonas sp. RV_A09_23b 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	889	889	99%	0.0	93%
GQ069777.1	Uncultured bacterium clone nbw233a08c1 16S ribosomal RNA gene, p	889	889	99%	0.0	93%
FM874443.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MD02G01	889	889	99%	0.0	93%
AB582881.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: M	887	887	93%	0.0	94%
DQ228718.2	Uncultured Comamonas sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	887	887	99%	0.0	93%
DQ070859.1	Uncultured Comamonas sp. clone nmt ct4 16S ribosomal RNA gene, p	887	887	99%	0.0	93%
GQ206315.1	Uncultured Comamonas sp. clone 4A1H6C9 16S ribosomal RNA gene,	883	883	99%	0.0	92%
AF078773.1	Comamonas sp. 12022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	883	883	99%	0.0	92%
FN421882.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 2_F07	881	881	97%	0.0	93%
GU472939.1	Uncultured Polaromonas sp. clone Bfa98 16S ribosomal RNA gene, pa	878	878	99%	0.0	92%
EU463101.1	Uncultured bacterium clone molerat_aai69h06 16S ribosomal RNA gen	878	878	99%	0.0	92%
AM697253.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001C094	878	878	99%	0.0	92%
JF915328.1	Comamonas koreensis strain NWJ116 16S ribosomal RNA gene, partial	876	876	97%	0.0	93%
JF915327.1	Comamonas koreensis strain NW15 16S ribosomal RNA gene, partial s	876	876	97%	0.0	93%
JF722672.1	Comamonas sp. JI-Soil-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	872	872	99%	0.0	92%
HQ893540.1	Comamonas aquatica strain MR 82 16S ribosomal RNA gene, partial s	872	872	99%	0.0	92%

CUADRO 9: Posibles bacterias resultado de la muestra número 5.

Como se puede observar en el Cuadro 9 las bacterias a destacar corresponden al género *Delftia* y *Comamonas* con una identidad máxima del 95 y 93% respectivamente. Dentro del género *Comamonas* destacan las especies *korrensis* 93% y *Comamonas aquatica* en el 92%.

3.1.1. Análisis molecular de la muestra 5 (cadena complementaria).

Repetiendo el mismo análisis para la cadena complementaria 5-pH cedida por secuenciación se obtuvo los resultados presentes en el cuadro 10.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF532869.1	Comamonas sp. D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	100%	0.0	95%
AJ550282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene isolate TK41	955	955	100%	0.0	95%
NR_025107.1	Comamonas koreensis strain KCTC 12005 16S ribosomal RNA, partial	952	952	100%	0.0	95%
FM874442.1	Uncultured beta proteobacterium clone Z-150 16S ribosomal RNA gene	950	950	100%	0.0	95%
FM874442.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MD02G01	950	950	100%	0.0	95%
EU088045.1	Endophytic bacterium WL6b 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	950	950	100%	0.0	95%
JN128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	933	933	98%	0.0	95%
AM697253.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001C094	933	933	100%	0.0	95%
HQ902633.1	Uncultured bacterium clone JB9 16S ribosomal RNA gene, partial seq	928	928	100%	0.0	94%
EU515237.1	Comamonas sp. CY 01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	922	922	100%	0.0	94%
GQ206315.1	Uncultured Comamonas sp. clone 4A1H6C9 16S ribosomal RNA gene,	917	917	100%	0.0	94%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	915	915	100%	0.0	94%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	915	915	100%	0.0	94%
AF418949.1	Uncultured bacterium clone HTBB6 16S ribosomal RNA gene, partial s	915	915	100%	0.0	94%
AF078773.1	Comamonas sp. 12022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	99%	0.0	94%
FN421882.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 2_F07	909	909	100%	0.0	94%
HM365953.1	Comamonas sp. RV_A09_23b 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	907	907	95%	0.0	95%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial se	905	905	100%	0.0	94%
AB187586.1	Comamonas granulii gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ko0	900	900	100%	0.0	94%
AY491629.1	Uncultured bacterium clone oca35 16S ribosomal RNA gene, partial s	896	896	100%	0.0	93%
JF808870.1	Uncultured Comamonas sp. clone R15-81 16S ribosomal RNA gene, p	894	894	100%	0.0	93%
JF808869.1	Uncultured Comamonas sp. clone R15-59 16S ribosomal RNA gene, p	894	894	100%	0.0	93%
JF697496.1	Uncultured bacterium clone reservoir-115 16S ribosomal RNA gene, r	894	894	100%	0.0	93%
GQ260128.2	Acidovorax konjaci strain BC2944 16S ribosomal RNA gene, partial se	894	894	100%	0.0	93%
FN794215.1	Comamonas sp. V2M3 partial 16S rRNA gene, strain V2M3	894	894	100%	0.0	93%
GU290321.1	Comamonas sp. 200914 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	894	894	100%	0.0	93%
EU917638.1	Uncultured bacterium clone CrustH09 16S ribosomal RNA gene, parti	894	894	100%	0.0	93%
HQ902633.1	Uncultured bacterium clone JB9 16S ribosomal RNA gene, partial seq	928	928	100%	0.0	94%
EU515237.1	Comamonas sp. CY 01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	922	922	100%	0.0	94%
GQ206315.1	Uncultured Comamonas sp. clone 4A1H6C9 16S ribosomal RNA gene,	917	917	100%	0.0	94%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	915	915	100%	0.0	94%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	915	915	100%	0.0	94%
AF418949.1	Uncultured bacterium clone HTBB6 16S ribosomal RNA gene, partial s	915	915	100%	0.0	94%
AF078773.1	Comamonas sp. 12022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	99%	0.0	94%
FN421882.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 2_F07	909	909	100%	0.0	94%
HM365953.1	Comamonas sp. RV_A09_23b 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	907	907	95%	0.0	95%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial se	905	905	100%	0.0	94%
AB187586.1	Comamonas granulii gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ko0	900	900	100%	0.0	94%
AY491629.1	Uncultured bacterium clone oca35 16S ribosomal RNA gene, partial s	896	896	100%	0.0	93%
JF808870.1	Uncultured Comamonas sp. clone R15-81 16S ribosomal RNA gene, p	894	894	100%	0.0	93%
JF808869.1	Uncultured Comamonas sp. clone R15-59 16S ribosomal RNA gene, p	894	894	100%	0.0	93%
JF697496.1	Uncultured bacterium clone reservoir-115 16S ribosomal RNA gene, r	894	894	100%	0.0	93%
GQ260128.2	Acidovorax konjaci strain BC2944 16S ribosomal RNA gene, partial se	894	894	100%	0.0	93%
FN794215.1	Comamonas sp. V2M3 partial 16S rRNA gene, strain V2M3	894	894	100%	0.0	93%
GU290321.1	Comamonas sp. 200914 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	894	894	100%	0.0	93%
EU917638.1	Uncultured bacterium clone CrustH09 16S ribosomal RNA gene, parti	894	894	100%	0.0	93%
EU104087.1	Uncultured bacterium clone M0111_93 16S ribosomal RNA gene, part	894	894	100%	0.0	93%
EU841517.1	Comamonas aquatica strain 339 16S ribosomal RNA gene, partial seq	894	894	100%	0.0	93%
AB430332.1	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence,	894	894	100%	0.0	93%
DQ523222.1	Uncultured bacterium clone KSC4-7 16S ribosomal RNA gene, partial	894	894	100%	0.0	93%
DQ446000.1	Uncultured beta proteobacterium clone SML_216_10 16S ribosomal F	894	894	99%	0.0	93%
AM184229.1	Comamonas terrigena partial 16S rRNA gene, strain WAB1888	894	894	100%	0.0	93%
AF137507.1	Acidovorax konjaci 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	894	894	100%	0.0	93%
AJ430343.1	Comamonas terrigena partial 16S rRNA gene, strain LMG 1249	894	894	100%	0.0	93%
AF078753.1	Acidovorax sp. IMI 357678 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	894	894	100%	0.0	93%
EU652485.1	Hydrogenophaga sp. JPB-3.10 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	891	891	100%	0.0	93%
JF817600.1	Uncultured Acidovorax sp. clone MFCBoq3-51 16S ribosomal RNA gene	889	889	100%	0.0	93%

CUADRO 10: Resultados para la muestra número 5, correspondientes a la cadena de ADN complementaria.

Al igual que en el caso anterior nos encontramos bacterias del género *Comamonas sp.* Con una identidad máxima de 95% en la especie *koreensis* y también hay resultados para el género *Acidorovax* con una identidad máxima del 95 a 93%.

3.2. Análisis molecular para la muestra 6.

Para la muestra 6 procedente de las bacterias localizadas de semilla de melón variedad Ricura, y una vez reordenada la secuenciación a través de programa Chroma Pro 1.5. y su posterior exportación al NCBI se obtuvo como resultado el cuadro 11 donde aparecen las bacterias con una gran similitud con nuestra bacteria muestra.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ652605.1	<i>Stenotrophomonas sp.</i> p22(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial se	1074	1074	99%	0.0	96%
HM748056.1	<i>Stenotrophomonas sp.</i> ICB385 16S ribosomal RNA gene, partial sequi	1074	1074	98%	0.0	96%
HM325030.1	Uncultured bacterium clone ncd437c05c1 16S ribosomal RNA gene, p	1074	1074	99%	0.0	96%
EF511479.1	Uncultured bacterium clone P5D15-471 16S ribosomal RNA gene, par	1074	1074	99%	0.0	96%
AY162068.1	Gamma proteobacterium PII_GH4.2.G5 small subunit ribosomal RNA q	1074	1074	99%	0.0	96%
AY162052.1	Gamma proteobacterium PI_GH4.1.G2 small subunit ribosomal RNA qe	1074	1074	99%	0.0	96%
FJ626647.1	<i>Stenotrophomonas sp.</i> MH128 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1070	1070	99%	0.0	96%
AJ131916.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , 16S rRNA gene, strain LMG 11002	1070	1070	99%	0.0	96%
JN033056.1	Uncultured bacterium clone 3-42035 16S ribosomal RNA gene, partia	1068	1068	99%	0.0	96%
FJ508925.1	Uncultured bacterium clone 16slp83-08h04.p1k 16S ribosomal RNA q	1068	1068	99%	0.0	96%
HQ671069.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain JKR32b 16S ribosomal RNA gene	1068	1068	99%	0.0	96%
HM010797.1	Uncultured bacterium clone FedNymph35 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HQ246221.1	<i>Pseudomonas sp.</i> 2A9S6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1068	1068	99%	0.0	96%
HQ246220.1	<i>Stenotrophomonas sp.</i> 2A9S2 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1068	1068	99%	0.0	96%
HM462353.1	Uncultured <i>Stenotrophomonas sp.</i> clone PtW-II-cl9 16S ribosomal RI	1068	1068	99%	0.0	96%
HM143858.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain AhsB4 16S ribosomal RNA gene,	1068	1068	99%	0.0	96%
HM186762.1	Uncultured bacterium clone HDB_SIOZ453 16S ribosomal RNA gene, I	1068	1068	99%	0.0	96%
HM186705.1	Uncultured bacterium clone HDB_SIOU428 16S ribosomal RNA gene, I	1068	1068	99%	0.0	96%
HM186618.1	Uncultured bacterium clone HDB_SIOT1789 16S ribosomal RNA gene,	1068	1068	99%	0.0	96%
HM334984.1	Uncultured bacterium clone ncd994q01c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM334496.1	Uncultured bacterium clone ncd987f01c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM314910.1	Uncultured bacterium clone ncd437h09c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM309167.1	Uncultured bacterium clone ncd910b10c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM276202.1	Uncultured bacterium clone ncd519e07c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM265311.1	Uncultured bacterium clone ncd183f08c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM265273.1	Uncultured bacterium clone ncd183c01c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM253509.1	Uncultured bacterium clone ncd45d07c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
GU569151.1	Uncultured <i>Stenotrophomonas sp.</i> clone UBXB8 16S ribosomal RNA q	1068	1068	99%	0.0	96%
GU563744.1	Uncultured bacterium clone CHINA11 16S ribosomal RNA gene, partia	1068	1068	99%	0.0	96%
GU563742.1	Uncultured <i>Stenotrophomonas sp.</i> clone CHINA59 16S ribosomal RNA	1068	1068	99%	0.0	96%

CUADRO 11: Resultados de la cadena de ADN correspondiente a la muestra 6.

Como se observa para esta muestra se ha obtenido como resultado bacterias del género *Stenotrophomonas sp.* Con una identidad máxima del 96%.

3.2.1. Análisis molecular para la muestra 6 de su cadena complementaria 6-pH.

Se utilizó la cadena complementaria de ADN de la muestra 6 para dar lugar a los siguientes resultados.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF511770.1	Uncultured bacterium clone P5D23-633 16S ribosomal RNA gene, par	1018	1018	99%	0.0	95%
GQ267816.1	Stenotrophomonas maltophilia strain PSM-5 16S ribosomal RNA gene	1016	1016	99%	0.0	95%
EF511450.1	Uncultured bacterium clone P5D15-639 16S ribosomal RNA gene, par	1016	1016	99%	0.0	95%
GQ280904.1	Stenotrophomonas maltophilia strain FF111 16S ribosomal RNA gene,	1014	1014	99%	0.0	95%
EU931549.1	Stenotrophomonas maltophilia strain ZFJ-10 16S ribosomal RNA gene	1014	1014	99%	0.0	95%
EF511812.1	Uncultured bacterium clone P5D23-435 16S ribosomal RNA gene, par	1014	1014	99%	0.0	95%
EF511711.1	Uncultured bacterium clone P5D23-459 16S ribosomal RNA gene, par	1014	1014	99%	0.0	95%
EF511676.1	Uncultured bacterium clone P5D23-620 16S ribosomal RNA gene, par	1014	1014	99%	0.0	95%
EF511505.1	Uncultured bacterium clone P5D15-442 16S ribosomal RNA gene, par	1014	1014	99%	0.0	95%
EF509771.1	Uncultured bacterium clone P4D1-571 16S ribosomal RNA gene, parti	1014	1014	99%	0.0	95%
EF509709.1	Uncultured bacterium clone P4D1-518 16S ribosomal RNA gene, parti	1014	1014	99%	0.0	95%
EF509747.1	Uncultured bacterium clone P4D1-742 16S ribosomal RNA gene, parti	1013	1013	99%	0.0	95%
AJ306833.1	Stenotrophomonas maltophilia 16S rRNA gene, isolate ON2	1013	1013	99%	0.0	95%
JN019029.1	Stenotrophomonas maltophilia strain RB5-M6 16S ribosomal RNA gene	1011	1011	99%	0.0	95%
HQ610659.1	Uncultured bacterium clone yf2clone70 16S ribosomal RNA gene, par	1011	1011	99%	0.0	95%
HQ403023.1	Uncultured bacterium clone fb103 16S ribosomal RNA gene, partial se	1011	1011	99%	0.0	95%
HQ200414.1	Stenotrophomonas maltophilia strain Dh 16S ribosomal RNA gene, pa	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ476444.1	Uncultured bacterium clone 1408-M13F-2 16S ribosomal RNA gene, p	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ206319.1	Uncultured Stenotrophomonas sp. clone A6H6M9 16S ribosomal RNA	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ478276.1	Stenotrophomonas sp. B4M-T 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ478270.1	Stenotrophomonas sp. R4M-R 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1011	1011	99%	0.0	95%
GU451210.1	Uncultured bacterium clone A4H1M9 16S ribosomal RNA gene, partial	1011	1011	99%	0.0	95%
GU362880.1	Pseudomonas sp. JY-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ179712.1	Uncultured Stenotrophomonas sp. clone VE12C08 16S ribosomal RNA	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ127873.1	Uncultured bacterium clone BACd-5E10 16S ribosomal RNA gene, par	1011	1011	99%	0.0	95%
FJ906801.1	Stenotrophomonas maltophilia strain PSM-2 16S ribosomal RNA gene	1011	1011	99%	0.0	95%
FJ765513.1	Stenotrophomonas maltophilia strain YHYJ-1 16S ribosomal RNA gene	1011	1011	99%	0.0	95%
FJ712028.1	Bacterium EMS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1011	1011	99%	0.0	95%
FJ626655.1	Stenotrophomonas sp. MH107 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1011	1011	99%	0.0	95%

CUADRO 12: Resultados de la cadena complementaria 6-pH, correspondiente a la muestra 6.

En el cuadro 12 se recogen los resultados obtenidos en los cuales aparece como la bacteria *Stenotrophomonas sp.* Como género de la enfermedad de las plántulas de melón.

No obstante se siguió haciendo análisis moleculares a distintas muestras, las cuales son mostradas a continuación.

3.3. Análisis molecular de la muestra 7.

La muestra 7 procedente de las bacterias localizadas de semilla de melón variedad Ricura, y una vez reordenada la secuenciación a través de programa Chroma Pro 1.5. y su posterior exportación al NCBI se obtuvo como resultado el cuadro 13 donde aparecen las bacterias con una gran similitud con nuestra bacteria muestra.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ905063.1	Uncultured bacterium clone THBP.0912.107 16S ribosomal RNA gene,	1186	1186	100%	0.0	99%
EU467917.1	Uncultured bacterium clone CE2_a08 16S ribosomal RNA gene, partia	1186	1186	100%	0.0	99%
EF204216.1	Delftia sp. H214 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
EF204215.1	Delftia sp. H213 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
EF204214.1	Delftia sp. H212 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
EF204213.1	Delftia sp. H209 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
EF204212.1	Delftia sp. H208 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
AF532869.1	Comamonas sp. D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
HM273525.1	Uncultured bacterium clone ncd517e05c1 16S ribosomal RNA gene, p	1181	1181	100%	0.0	98%
EF565937.1	Comamonas sp. NF27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1155	1155	100%	0.0	98%
JN128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1147	1147	100%	0.0	98%
HM298901.1	Uncultured bacterium clone ncd902f09c1 16S ribosomal RNA gene, p	1147	1147	100%	0.0	98%
AJ550282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene, isolate TK41	1142	1142	100%	0.0	97%
FJ946520.1	Uncultured Comamonas sp. clone LSS-E5 16S ribosomal RNA gene, p	1136	1136	100%	0.0	97%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial se	1133	1133	100%	0.0	97%
JF218140.1	Uncultured bacterium clone ncd2540d08c1 16S ribosomal RNA gene,	1125	1125	100%	0.0	97%
JF209871.1	Uncultured bacterium clone ncd2414d11c1 16S ribosomal RNA gene,	1125	1125	100%	0.0	97%
JF200954.1	Uncultured bacterium clone ncd2413q04c1 16S ribosomal RNA gene,	1125	1125	100%	0.0	97%
GQ206315.1	Uncultured Comamonas sp. clone 4A1H6C9 16S ribosomal RNA gene,	1125	1125	100%	0.0	97%
GQ069777.1	Uncultured bacterium clone nbw233a08c1 16S ribosomal RNA gene, I	1125	1125	100%	0.0	97%
FM874442.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MD02G01	1125	1125	100%	0.0	97%
DQ228718.2	Uncultured Comamonas sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1125	1125	100%	0.0	97%
DQ070859.1	Uncultured Comamonas sp. clone nmt ct4 16S ribosomal RNA gene, I	1125	1125	100%	0.0	97%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	1122	1122	100%	0.0	97%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	1116	1116	100%	0.0	97%
AM697253.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001C094	1114	1114	100%	0.0	97%
EU463101.1	Uncultured bacterium clone molerat_aai69h06 16S ribosomal RNA ge	1103	1103	100%	0.0	96%
AF078773.1	Comamonas sp. 12022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	96%
NR_025107.1	Comamonas koreensis strain KCTC 12005 16S ribosomal RNA, partial	1099	1099	100%	0.0	96%
GU472943.1	Uncultured Variovorax sp. clone Bfa102 16S ribosomal RNA gene, par	1098	1098	100%	0.0	96%

CUADRO 13: Resultados obtenidos para la muestra número 7.

En el cuadro 13, se recogen los resultados obtenidos para la muestra número 7, la bacteria presente en este ensayo ha sido *Comamonas sp.* Con un 99% de identidad máxima.

3.3.1. Muestra 7, cadena complementaria de ADN 7-pH.

Se utilizó la cadena complementaria de ADN de la muestra 7 para dar lugar a los siguientes resultados mostrados en el cuadro 14.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FM874442.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MD02G01	1002	1002	99%	0.0	96%
EU088045.1	Endophytic bacterium WL6b 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	1000	1000	99%	0.0	96%
NR_025107.1	Comamonas koreensis strain KCTC 12005 16S ribosomal RNA, partial	998	998	99%	0.0	95%
AF532869.1	Comamonas sp. D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	996	996	99%	0.0	95%
AJ550282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene, isolate TK41	992	992	98%	0.0	95%
HQ224901.1	Uncultured beta proteobacterium clone 2-150 16S ribosomal RNA gei	990	990	99%	0.0	95%
HQ902633.1	Uncultured bacterium clone JB9 16S ribosomal RNA gene, partial seq	979	979	99%	0.0	95%
AM697253.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001C094	979	979	99%	0.0	95%
GQ206315.1	Uncultured Comamonas sp. clone 4A1H6C9 16S ribosomal RNA gene,	966	966	99%	0.0	95%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial se	966	966	99%	0.0	94%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	966	966	99%	0.0	94%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	966	966	99%	0.0	94%
AF418949.1	Uncultured bacterium clone HTBB6 16S ribosomal RNA gene, partial s	966	966	99%	0.0	94%
JN128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	963	963	94%	0.0	96%
EU515237.1	Comamonas sp. CY 01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	963	963	96%	0.0	96%
AF078773.1	Comamonas sp. 12022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	94%
EU841530.1	Comamonas aquatica strain 634 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841529.1	Comamonas aquatica strain 617 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841528.1	Comamonas aquatica strain 532 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841527.1	Comamonas aquatica strain 530 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841526.1	Comamonas aquatica strain 525 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841525.1	Comamonas aquatica strain 519 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841524.1	Comamonas aquatica strain 510 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841523.1	Comamonas aquatica strain 503 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841521.1	Comamonas aquatica strain 431 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841518.1	Comamonas aquatica strain 403 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841516.1	Comamonas aquatica strain 337 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841515.1	Comamonas aquatica strain 336 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841514.1	Comamonas aquatica strain 334 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841513.1	Comamonas aquatica strain 319 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841512.1	Comamonas aquatica strain 318 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841511.1	Comamonas aquatica strain 317 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841510.1	Comamonas aquatica strain 239 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841509.1	Comamonas aquatica strain 118 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841508.1	Comamonas aquatica strain 117 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU800469.1	Uncultured bacterium clone 2C228581 16S ribosomal RNA gene, part	946	946	99%	0.0	94%
EF426453.1	Comamonas sp. L11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	946	946	99%	0.0	94%
EU252489.1	Comamonas sp. AM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	946	946	99%	0.0	94%

CUADRO 14: Resultados obtenidos de la muestra 7, con su cadena de ADN complementaria.

Como se aprecia en el cuadro 14 las bacterias que predominan en el resultado de tal análisis son del género *Comamonas koreensis* con un 95% de identidad máxima y *Comamonas aquatica* con un 94% de identidad máxima.

3.4. Análisis de la muestra 10.

La muestra 10 procedente de las bacterias localizadas de semilla de melón variedad Ricura, y una vez reordenada la secuenciación a través de programa Chroma Pro 1.5. y su posterior exportación al NCBI se obtuvo como resultado el cuadro 15 donde aparecen las bacterias con una gran similitud con nuestra bacteria muestra.

EF446175.1	Uncultured bacterium clone filnov03d5 16S ribosomal RNA gene, part	477	477	88%	3e-131	88%
EF446174.1	Uncultured bacterium clone filnov03d3 16S ribosomal RNA gene, part	477	477	88%	3e-131	88%
AB176232.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176230.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176227.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176192.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176188.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176174.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176171.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
DQ303264.1	Uncultured bacterium clone fq3 16S ribosomal RNA gene, partial seq	477	477	88%	3e-131	88%
JF914329.1	Uncultured bacterium clone G73 16S ribosomal RNA gene, partial seq	475	475	80%	9e-131	90%
JF799965.1	Acinetobacter sp. K75C-11A 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	475	475	80%	9e-131	90%
JF799960.1	Acinetobacter sp. K75C-8A 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	475	475	80%	9e-131	90%
JF343128.1	Acinetobacter sp. IARI- CS-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	475	475	87%	9e-131	88%
JH259112.2	Uncultured bacterium clone EZSDV 16S ribosomal RNA gene, partial :	475	475	80%	9e-131	90%

CUADRO 15: Resultados obtenidos para la muestra 10.

El género bacteriano que predomina en los resultados de esta muestra es el *Acinetobacter sp.* Con una identidad máxima del 88%.

4. DISCUSIONES.

Teniendo en cuenta todos los resultados de los muestreos de placas, y conociendo los géneros bacterianos y demás hongos presentes podemos llegar a la siguiente discusión.

Las plántulas estudiadas procedentes del semillero “El Plantel”, las cuales presentaban diferentes fisiopatías, así como daños externos han mostrado en el análisis del material vegetal sobre medio agarizado en cada una de las plántulas, una serie de hongos y bacterias. Así como en el caso de las semillas, recordando que de 100 semillas estudiadas, 41 de ellas presentaron síntomas bacterianos. Además por las características organolépticas del agua de riego presentaba un olor característico a pudrición característico al género *Comamonas* sp.

Se puede decir de los resultados obtenidos que no nos aseguran completamente un género y especie concreto, puesto que los géneros obtenidos *Comamonas*, *Acidovorax*, *Stenotrophomonas* sp y *Defltia* presentaron una identidad en todos sus casos superior al 88% llegando en algunos casos al 99% como es el caso de *Comamonas* sp. en la muestra número 7.

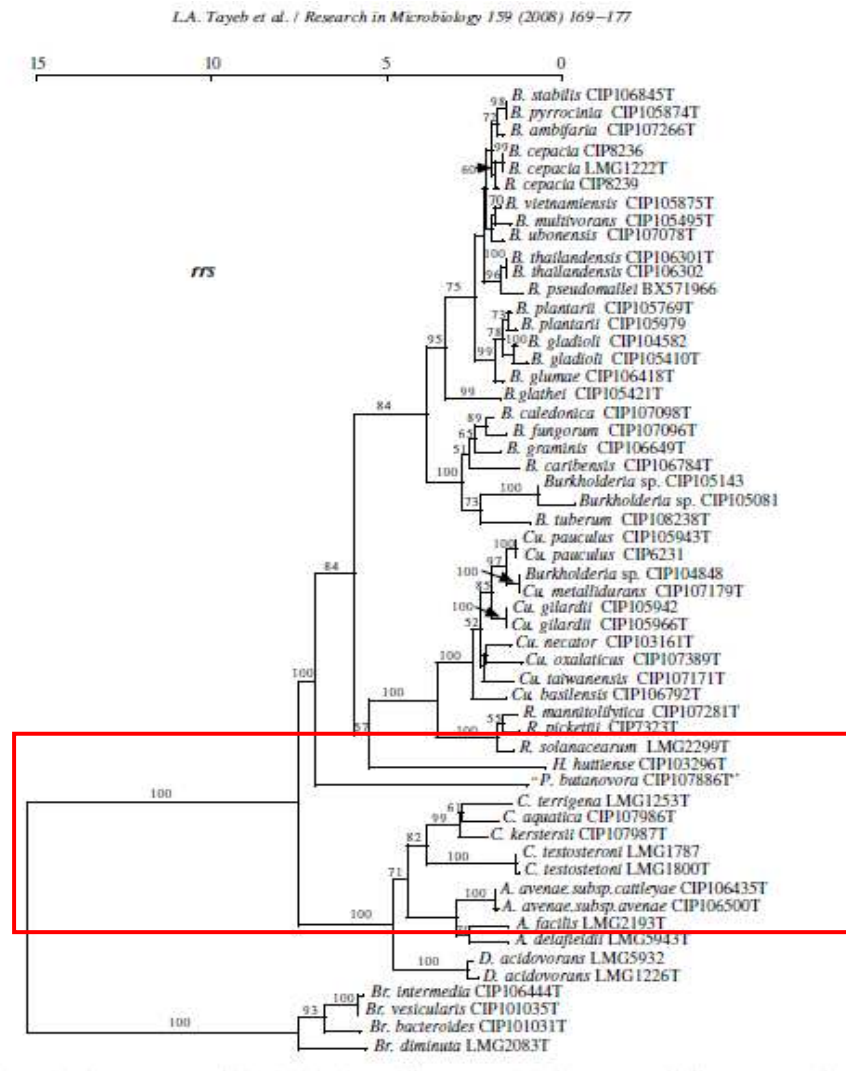


FIGURA 25: Esquema general de ordenación de las bacterias según sus 100 pares de bases.

V. CONCLUSIONES.

Tras el análisis de los resultados obtenidos a partir de la evaluación realizada a lo largo de todo el proceso en el cual se ha llevado a cabo el diagnóstico fitopatológico, se han obtenido una serie de conclusiones que se citan a continuación.

1. El agente principal causante de la enfermedad ha sido *Cladosporium cucumerinum*. No se descarta que el problema patológico sea de etiología compleja debido a la presencia de bacterias del género *Comamonas sp.* en semilla.
2. La identificación de las bacterias presente en las muestras mediante el análisis del ADNr 16S no ha permitido la identificación concreta de una especie, debido al bajo porcentaje de similitud encontrado.
3. Además, en este problema fitopatológico se han detectado especies de hongos tales como, *Pythium aphanidermatum*, *Didymella Bryoniae* y *Rhizoctonia solani* especies típicas detectadas en semillero.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

AVILÉS M, TELLO J.C. 2002 Revista Horticom Capítulo X: Control sanitario de los semilleros hortícolas pág.: 129-137

BRAVO CAPARRÓS D. 2009. Efecto del lavado de compost para sustrato de semillero sobre la capa germinativa en sandía y melón. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Almería.

CAJA RURAL (2010): http://www.ruralcaja.org/descarga/portainj_melon.pdf

CAMACHO FERRE F. TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN EN CULTIVOS PROTEGIDOS, 2003. Instituto Cajamar. Almería TOMO 1 pág.210-216, TOMO 2 pág.: 457-459

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA. 2010. Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera. Junta de Andalucía. España

<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/obsprecios/servlet/FrontController>.
<http://www.juntadeandalucia.es/boja/boletines/2009/157/d/27.html>.

EL PLANTEL, SEMILLEROS 2011. www.elplantelsemilleros.com

FAO (2002). Dirección de producción y protección vegetal 90. Manual preparado por el grupo de cultivos hortícolas. Dirección de producción y protección vegetal. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Capítulo 6.

FERNÁNDEZ I. (2010), Rijk Zwaan muestra todas su variedades de melón en su “Semana Internacional”. FhAlmería Junio 2010, nº 31, pág. 3.

FERNÁNDEZ LAVANDERA, O. y PIZARRO CHECA, A. (1981): “Almería: la técnica del enarenado transforma un desierto”. Revista de Estudios Agrosociales. nº 115. pp. 31-70.

FERNÁNDEZ. M, GÓMEZ J. 1993. Horticultura global: Revista de industria, distribución y socioeconómica hortícola, N° 90 pág. 32-47.

GAMAYO DÍAZ J.D., (2000) Plagas y enfermedades del melón. Cultivos intensivos. Pág. 58-62.

GARCÉS FIALLOS F.R., MELO REIS E. (2009) . Control de bacteriosis en el cultivo de melón. Unidad Técnica Estatal de Quevedo (Brasil), Unidad de investigación Científica y Tecnológica.

GARCÍA-JIMÉNEZ J. , VELÁZQUEZ M.T., ALFARO A. (1989) Boletín de sanidad vegetal Plagas, 4: 333-342.

GUIRAO P., PEREZ GARCÍA J.J., CENÍS ANADÓN J.J., SANCHEZ ESCRIBANO E.M., GARCÍA J. (1996) Revista Agropecuaria N° 766, Biología molecular aplicada a la hortofruticultura. La técnica PCR pág.: 401

GUZMAN J.M., 2002. 2º simposio Nacional de Horticultura. Conferencias y cursos sobre nutrición de cultivos hortícolas. X. Acondicionamiento nutritivo en semilleros y respuestas postrasplante en hortalizas.

HORTICOM (2011). www.horticom.com. Junio 2011.

JUNTA DE ANDALUCÍA (2009) Balance estadístico, Secretaría general del medio Rural y de la Producción Ecológica

Ley 30/2006, de 26 de julio, de semillas y plantas de vivero y de recursos fitogenéticos

MARM, 2010. Estadísticas. Avances de superficies y producciones de cultivos. España.

http://www.marm.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_hortint%2Fhortint_2003_4_2_30_36.pdf

MARTÍNEZ-RESTOY R.E, DIÁNEZ F., SANTOS M., DE CARA M., FERRANDIZ HERNANDEZ J., TELLO J.C.(2006) Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, N° 32 pág.: 673-683

NAVARRO, E. M. (2008) Influencia de las alteraciones textural del suelo sobre la calidad del melón galia cultivado en invernadero. Tesis Doctoral. Universidad de Almería, Universidad de Granada.

RIJKZ WAAN, Casa de semillas 20110: www.rijkszwaan.es

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., EHRLICH, H.A.1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.

SAMBROOK, J, MANIATIS, T., AND FRISCH, E. F. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor, USA

TAYEB L.A., LEFEVRE M., PASSET V., DIANCOURT L., BRISSE S., GRIMONT P. (2008) Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences.. *Institut Pasteur. Research in Microbiology* 159, pág. 169-177

TELLO, J.C. 2003. Evolución de las enfermedades hortícolas en el sureste español. Perspectivas de futuro y alternativas a las aplicaciones fitosanitarias actuales. En: *Técnicas de producción en cultivos protegidos*. Tomo 1. Ed: Caja Rural Intermediterránea, Cajamar, Almería. 373 pp.

ZARRILLI, A. (2003). La Huerta de Europa. *Revista de estudios rurales*, vol. 4 n° 7. Centro de Estudios Históricos Rurale. Mundo agrario. Obtenido el 26/04/2011 en: <http://redalyc.uaemex.mx>

INDICE

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA HORTICULTURA INTENSIVA.....	7
1.1. Horticultura en Almería.....	9
1.1.1. Producción de melón en Almería.....	9
2. SEMILLEROS: BASE DE LA HORTICULTURA ALMERIENSE.....	10
2.1. Problemática de los semilleros.....	10
2.1.1. Enfermedades de las plántulas en los semilleros.....	11
3. OBJETIVOS DE ESTE ENSAYO.....	11

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN DE SEMILLERO HORTÍCOLA.....	12
2. LEGISLACIÓN PARA SEMILLEROS.....	13
2.1. Semillas.....	13
2.2. Substratos	13
2.3. Semilleros.....	13
3. INSTALACIONES.....	16
3.1. Invernaderos	16
3.2. Maquinaria de siembra.....	18
3.3. Cámara de germinación	20
3.4. Cámara de cultivo.....	20
3.5. Taller de injertos.....	21
3.5.1. Injertos.....	21
3.5.1.1. Tipos de injertos.....	21
3.6. Banquetas de cultivo.....	22
3.7. Sistemas de riego.....	23
3.8. Sistemas de tratamientos fitosanitarios.....	23
3.9. Climatización.....	24
4. MATERIALES.....	26
4.1. Substratos.....	26
4.2. Bandejas y fundas.....	27
4.3. Otros materiales.....	27
5. CULTIVOS.....	28

6.	LABORES DE CULTIVO.....	30
6.1.	Riego.....	30
6.2.	Tratamientos fitosanitarios.....	30
6.2.1.	Campaña de Primavera-Verano.....	31
6.2.2.	Campaña de Otoño-Invierno.....	31
7.	PROCESO DE PRODUCCIÓN.....	32
8.	VENTAJAS QUE PROPORCIONAN LOS SEMILLEROS.....	34
8.1.	Normas generales para una buena germinación.....	34
8.2.	Tiempo en semillero.....	35
9.	DESARROLLO DE PLÁNTULAS.....	36
9.1.	Acondicionamiento y control.....	36
10.	ENFERMEDADES DE LOS SEMILLEROS.....	37
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.	
1.	EMPLAZAMIENTO DEL ENSAYO.....	39
1.1.	Ubicación del semillero.....	39
1.2.	Características del semillero.....	39
1.2.1.	Exportación e importación.....	40
1.2.2.	Sistema de riego.....	40
1.2.3.	Siembra.....	41
1.2.4.	Tipos de sustratos.....	41
1.2.5.	Clima.....	42
2.	MATERIAL VEGETAL.....	43
3.	MÉTODO EXPERIMENTAL.....	44
3.1.	Análisis de plántulas y semillas.....	44
3.1.1.	Análisis de plántulas.....	44
3.1.1.1.	Selección del material vegetal.....	44
3.1.1.2.	Estudio de las plántulas.....	44
3.1.1.3.	Análisis de los daños.....	46
3.1.2.	Análisis de semillas.....	47
4.	IDENTIFICACIÓN DE RESULTADOS EN PLACA.....	49
4.1.	Identificación de hongos.....	49

4.2. Identificación de bacterias.....	49
5. EXTRACCIÓN DEL ADN SIGUIENDO EL PROTOCOLO E.Z.N.A.....	50
5.1. Los indicadores.....	51
5.2. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR.....	52
5.3. Electroforesis de los productos de la PCR.....	58
6. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR.....	62
7. MEDIOS DE CULTIVO.....	63
7.1. Medio Caldo Nutritivo (CN).....	63
7.2. Medio Agar-Patata-Dextrosa (PDA).....	63
7.3. Medio TSA.....	64
8. ANÁLISIS MOLECULAR.....	64
8.1. Ordenación del ADN de las muestras estudiadas.....	64
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	
1. IDENTIFICACIÓN DE RESULTADOS.....	65
1.1. Método de análisis para los resultados obtenidos en el análisis de las plántulas.....	66
1.2. Resultados obtenidos en placas.....	66
1.2.1. Muestreos en placas.....	66
1.2.2. Muestreo en semillas.....	75
2. LA ELECTROFORESIS, RESULTADOS DE LA PCR.....	76
3. ANÁLISIS MOLECULAR.....	77
3.1. Análisis molecular para la muestra 5.....	77
3.1.1. Análisis molecular de la muestra 5 (cadena complementaria)....	78
3.2. Análisis molecular para la muestra 6.....	79
3.2.1. Análisis molecular para la muestra 6 de su cadena complementaria 6-pH.....	80
3.3. Análisis molecular de la muestra 7.....	81
3.3.1. Muestra 7, cadena complementaria de ADN, 7-pH.....	82
3.4. Análisis de la muestra 10.....	83
4. DISCUSIONES.....	84
V. CONCLUSIONES.....	86
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	87

INDICE DE CUADROS.

CUADRO 1: <i>Temperaturas óptimas de las especies más cultivadas FUENTE: Camacho, 2003</i>	28
CUADRO 2: <i>Periodos de tiempo necesarios para las especies más cultivadas. Fuente: Camacho, 2003</i>	28
CUADRO 3: <i>Características de las especies más cultivadas. Fuente: Camacho, 2003</i>	29
CUADRO 4: <i>Posibles fechas de siembra para melón y tiempo en semillero</i>	35
CUADRO 5: <i>Reactivos para la reacción de PCR</i>	56
CUADRO 6: <i>Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de los distintos tamaños de fragmentos de ADN</i>	58
CUADRO 7: <i>Resultados registrados en las placas procedentes del análisis de plántulas de melón</i>	74
CUADRO 8: <i>resultados registrados en Placa Petri procedentes del análisis de semillas</i>	75
CUADRO 9: <i>Posibles bacterias resultado de la muestra número 5</i>	77
CUADRO 10: <i>Resultados para la muestra número 5, correspondientes a la cadena de ADN complementaria</i>	78
CUADRO 11: <i>Resultados de la cadena de ADN correspondiente a la muestra 6</i>	79
CUADRO 12: <i>Resultados de la cadena complementaria 6-pH, correspondiente a la muestra 6</i>	80
CUADRO 13: <i>Resultados obtenidos para la muestra número 7</i>	81
CUADRO 14: <i>Resultados obtenidos de la muestra 7, con su cadena de ADN complementaria</i>	82
CUADRO 15: <i>Resultados obtenidos para la muestra 10</i>	83

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. <i>Campos de invernaderos en Almería. Fuente: www.dw-world.de.....</i>	8
FIGURA 2: <i>Detalle colocación de bandejas en semillero.....</i>	17
FIGURA 3: <i>Detalle estructura tipo multitúnel en semillero Fuente: Invernaderos el pilar.....</i>	18
FIGURA 4: <i>Detalle de banqueta de cultivo. Fuente: Horticom.....</i>	22
FIGURA 5: <i>Localización de El Plantel semilleros.....</i>	39
FIGURA 6: <i>Tren de riego automático, Semillero el Plantel.....</i>	40
FIGURAS 7: <i>Equipos de siembra.....</i>	41
FIGURA 8: <i>Sustratos utilizados por El Plantel Semilleros.....</i>	41
FIGURA 9: <i>Fruto de melón cv. Ricura .Fuente: http://www.ruralcaja.org/download/portainj_melon.pdf.....</i>	43
FIGURAS 10: <i>Selección de las plántulas muestreadas.....</i>	45
FIGURAS 11: <i>Estudio y anotación de los daños en las plántulas.....</i>	46
FIGURA 12: <i>Distribución de semillas enplacas.....</i>	47
FIGURA 13: <i>Semillas de melón Ricura, pasadas 48 horas a temperatura ambiente...48</i>	
FIGURA 14: <i>Pasos básicos de la PCR (de Andy Vierstracte 1999).....</i>	54
FIGURA 15: <i>Amplificación exponencial del PCR.....</i>	55
FIGURA 16: <i>Termociclador usado en el presente PFC.....</i>	57
FIGURA 17: <i>Termociclador donde podemos observar las diferentes partes para su programación y posterior funcionamiento.....</i>	57
FIGURA 18: <i>Placas de metacrilato, con el peine para hacer los pocillos.....</i>	59
FIGURA 19: <i>Gel de agarosa líquido, al disminuir la temperatura solidificará.....</i>	60
FIGURA 20. <i>Carga del gel de agarosa, y detalle de la carga.....</i>	60

FIGURA 21. <i>Fuente de alimentación conectada al gel</i>	61
FIGURA 22. <i>Lámpara de luz ultravioleta para la visualización de geles</i>	61
FIGURA 23: <i>Resultado de las placas con las muestras de plántulas, pasado 24 horas en estufa</i>	65
FIGURA 24: <i>Resultados obtenidos de la tinción del gel, visto en la lámpara ultravioleta</i>	76
FIGURA 25: <i>Esquema general de ordenación de las bacterias según sus 100 pares de bases</i>	84
FIGURA 26: <i>Detalle del esquema general de clasificación bacteriana</i>	85

I. INTERÉS Y OBJETIVOS.

1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA HORTICULTURA INTENSIVA.

El sector hortofrutícola tiene un papel muy importante tanto dentro de la agricultura como en el conjunto de la economía española. Su participación en la producción final agraria alcanza el 37%, cifra altamente significativa y que ha aumentado en los últimos años desde un 32% en 2000 hasta el 37% de 2006, último año con datos disponibles. (MARM, 2011).

El sector hortícola constituye un sector estratégico para la economía nacional y andaluza. Por su aportación a la producción de la rama agraria, a la vez que por su clara vocación exportadora, juega un papel fundamental en el equilibrio de nuestra balanza comercial. Representa junto con el sector de los productos hortícolas al aire libre más del 25% de la producción de la rama agraria andaluza y más del 30% de la producción vegetal.

Por otra parte, la actividad hortícola es la principal fuente de ingresos de un gran número de familias andaluzas, integrando el motor económico y social de determinadas comarcas de nuestra geografía. (Junta de Andalucía, 2011)

La gran incidencia que tiene la agricultura sobre el conjunto de la economía de Almería, es un hecho diferencial de la provincia, hasta el punto que, durante años, la evolución de la renta y el empleo provincial ha estado determinada por la marcha de la campaña hortícola. Hablar de agricultura en Almería es hablar de la producción hortícola en cultivos intensivos (invernaderos) ya que, la producción final agraria la aporta este subgrupo de productos.

En Almería, el sector primario ha sido el que ha conseguido sacar a la provincia de una prolongada situación de pobreza en las últimas cuatro décadas. De este modo es posible hablar del “modelo Almería”, modelo que es objeto de estudio de muchas universidades e instituciones con el fin de tratar de exportar este modelo a otras zonas del mundo, que se encuentran en situación similar a como se encontraba la provincia de almeriense hace años. Este modelo representa el máximo exponente en agricultura intensiva bajo plástico en España a nivel tecnológico y se ha desarrollado principalmente durante los últimos treinta años.



FIGURA 1. Campos de invernaderos en Almería .FUENTE: www.dw-world.de

Fernández Lavandera y Pizarro Checa (1981) plasmaron la sorpresa y admiración de observar como una provincia española en la periferia de la periferia, desertizada y erosionada en buena parte de su territorio, con carencias muy graves en sus infraestructuras, carente casi por completo de industria, sin burguesía autónoma de cierta entidad ha pasado de ser la última provincia en renta per cápita en el año 1969, a ocupar posiciones intermedias en el “ranking” español, aumentando su aportación al PIB nacional en casi un 50 % entre 1955 y 2002; con el siguiente párrafo:

“La segunda mitad de nuestro siglo nos tiene acostumbrados a los milagros (...) Pero surge ahora el caso de Almería y, contra las leyes económicas y sociales, resulta que se ha conseguido un gran desarrollo, precisamente gracias a la agricultura; hecho tan singular que no cabe calificarlo más que así: el milagro del milagro”.

Uno de los índices que se emplea, para conocer la evolución económica de una zona es analizar la evolución de su población, y la provincia durante una parte del siglo XX ha sufrido una gran depresión económica la cual se refleja en la evolución de su población. Mientras que en el conjunto de España y Andalucía la población crece ininterrumpidamente, Almería permaneció estancada incluso en retroceso. Consecuencia de lo anterior es que cuando el conjunto de España dobla su número de habitantes, en la provincia solo aumenta un 46% la población. Este fenómeno se dio hasta la década de los ochenta, a partir de la cual habido un aumento en la población del 33%, cita que dobla el 17% que ha crecido Andalucía y muy superior al crecimiento en España que ha crecido tan solo un 11%.(Camacho Ferre, F., 2003). En los últimos 20 años es donde se produce un crecimiento más acusado de la población en la provincia, debido al gran número de inmigrantes que han llegado atraídos por la demanda del mercado laboral del sector agrario.

El modelo se caracteriza por ser muy intensivo tanto en capital como en mano de obra, lo cual demanda un substancial desembolso de dinero para conservar las explotaciones. La mano de obra en general supone la mayor parte de los gastos, ya que se requiere de muchos trabajadores durante el ciclo de cultivo. Es por ello que la agricultura intensiva del litoral almeriense destaca en el conjunto autonómico y nacional por su fuerte demanda de trabajo (Zarilli, A.; 2003).

Desde el punto de vista económico si observamos la evolución de la renta per cápita en Almería desde 1967, según los datos del servicio de estudios del BBVA, y los comparamos con los del conjunto de España, se pueden apreciar tres etapas; en los años setenta se produce un gran despegue de la economía almeriense, manteniendo tasas de crecimiento superiores a la española y por tanto, aproximándose de manera considerable a la renta media, alcanzando al final de la década un 88% de la media nacional; en los años ochenta y hasta la crisis del 93, Almería crece en términos de renta per cápita a un nivel muy similar al conjunto de España manteniéndose el diferencial respecto a los valores medios. Desde 1993, año que coincide con la creación del Mercado único Europeo, Almería vuelve a crecer a un ritmo superior a la media española hasta colocarse por encima del 90% de la renta familiar en España.

En la actualidad son muchos los factores que afectan al sector hortícola almeriense, los acuerdos de la Organización Mundial del Comercio tendentes a la liberación de los mercados, inciden cada vez más en la competitividad de un sector que nunca se ha contado entre los más protegidos dentro de la Unión Europea. Así mismo, el continuo aumento de los precios de los insumos agrícolas, provoca una reducción paulatina de los márgenes de producción.

Se trata entonces de un sector con una alta capacidad de generar empleo y cuya importancia trasciende al sector agrario, siendo el motor del desarrollo de la provincia junto con el turismo y llevando consigo un gran desarrollo de la industria auxiliar.

1.1. Horticultura en Almería.

Almería, es la principal provincia de Andalucía en producción hortofrutícola, la cual registró el pasado 2010 una producción total de 4888959 toneladas.

La producción hortícola obtenida en Almería se desarrolla mayoritariamente en cultivo bajo abrigo, (Tello, 2003), proporcionando así las características óptimas en producción y en calidad.

1.1.1. Producción de melón en Almería.

Al centrarnos en la producción de melón Almería logró establecer en la campaña 2010 una superficie de 4030 hectáreas, entre campo abierto e invernaderos, con una producción total de 141964 toneladas. (CONSEJERIA DE AGRICULTURA Y PESCA, JUNTA DE ANDALUCIA, 2011).

Y a nivel nacional se registran datos de tal índole; España, según la FAO (2003) fue el 5º productor de melones en el mundo, después de China, Turquía, Estados Unidos e Irán, situándose por encima de Rumania, Egipto, India, México e Italia; en exportaciones su puesto fue el 3º, después de Brasil y Guatemala.

2. SEMILLEROS: BASE DE LA HORTICULTURA ALMERIENSE.

El empleo de semillas y plantas de vivero es un factor básico para la actividad agraria, por constituir una de las inversiones con efecto multiplicador más elevado, por su significativa y positiva incidencia en la capacidad productiva, resistencia a agentes adversos y calidad de las cosechas. Mediante las semillas y plantas de vivero se logra, además, una transferencia plena de tecnología de vanguardia desde el laboratorio de investigación al campo de cultivo.

Se entiende por plantas de vivero las plantas enteras y partes de plantas destinadas al establecimiento de plantaciones, así como los materiales vegetales no incluidos en la definición de semillas y que se utilicen para la reproducción o multiplicación, incluidos los clones. (Ley 30/2006, de 26 de julio, de semillas y plantas de vivero y de recursos fitogenéticos).

El origen en su totalidad de las plantas que se siembran en las explotaciones protegidas, proceden en su gran mayoría de semilleros, en los cuales se lleva a cabo la siembra y germinación de las semillas así como el cuidado de las plántulas desde su primer estadio hasta que alcanzan el desarrollo propicio para el trasplante. (Camacho, *et al.* 2003).

Los semilleros hortícolas de España y especialmente en Almería se han hecho imprescindibles en la cadena de producción de la horticultura intensiva, realizando una doble función: (Guzmán, 2002)

- Germinación de semillas
- Obtención de plántulas de calidad

2.1. Problemática de los semilleros.

Uno de los aspectos que se debe tener en cuenta, es que cuando las plántulas se encuentran en fase de germinación, emergencia y desarrollo inicial son muy susceptibles a la infección por los patógenos; esto es debido a los exudados liberados durante la germinación de las semillas proveen al patógeno edáfico de una base nutritiva que facilita la patogénesis y a que los tejidos jóvenes tienen una escasa resistencia constitutiva a las enfermedades. (Avilés, *et al.* 2002).

Estas enfermedades como se ha citado anteriormente afectan a las semillas antes de germinar, durante la germinación y después de la emergencia hasta que aparece la primera o segunda hoja verdadera (Camacho, *et al.* 2003), este estado también es reconocido por el nombre de "*damping-off*" dando lugar a plantas de escaso desarrollo y nulo valor comercial (Avilés, *et al.* 2002)

Dependiendo del tipo de semilla que tratemos se tendrán que tomar consideraciones específicas para cada una de ellas ya que pueden resultar perjudiciales para el proceso productivo.

Tenemos que tener presente que la enfermedad no solo se manifiesta durante la fase de emergencia, sino que en numerosas ocasiones sus síntomas aparecen una vez que la plántula ha sido trasplantada al invernadero. (Gómez, 1993)

2.1.1. Enfermedades de las plántulas en los semilleros.

Las enfermedades más relevantes que nos podemos encontrar en un semillero pueden ser transmitidas a través de las semillas, como es el caso de algunos virus, virus del mosaico de la calabaza (SqMV), causando daños en semilleros de plántulas de calabaza para su posterior injerto en melón y sandía (Avilés, *et al* 2002) o el mosaico del tomate, TMV portados por las simientes y cuya manifestación sintomatología ocurre en pleno cultivo (Camacho, *et al* 2003).

Además las plántulas pueden verse afectadas por la acción de bacterias fitopatógenas, así como las infecciones ocasionadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en tomate y *P. syringae* pv. *Lanchrymans* en semilleros de melón.

Aunque también pueden ocasionarse estas enfermedades por los hongos presentes en el suelo entre los que se pueden destacar *Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani*.

3. OBJETIVOS DE ESTE ENSAYO.

El estudio de sanidad de un semillero está centrado en la investigación de cuál ha sido la causa agente que ha provocado la depreciación del cultivo así como la disminución en su calidad, por tanto el presente trabajo tiene por objetivo diagnosticar los problemas patológicos detectados en un semillero almeriense sobre plántulas de melón.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN DE SEMILLERO HORTÍCOLA.

Tradicionalmente se ha entendido como una parcela de cultivo con la suficiente protección para llevar a cabo la germinación de las semillas y el cuidado de las plántulas en su primer estadio de desarrollo, hasta el momento del trasplante.

Actualmente los semilleros profesionales son empresas de servicios destinadas exclusivamente a la producción de plantas, transformando las semillas en plántulas con las debidas garantías vegetativas y fitosanitarias, ofreciendo un asesoramiento técnico en la elección de variedades, fechas óptimas de trasplante, seguimiento post-trasplante y recomendaciones de cultivo idóneas.

El constante avance de la horticultura mediterránea de los últimos treinta años ha llevado consigo el desarrollo de los sectores auxiliares (riego, invernaderos, plásticos, semillas, fertilizantes, etc.), convirtiéndola en una horticultura totalmente intensiva. Paralelamente se han desarrollado los semilleros hortícolas.

En la década de los años 70 los agricultores se producían sus propias plantas por el sistema tradicional de almaciga, realizando trasplantes a raíz desnuda, es más existía un comercio de plántulas entre los propios agricultores.

Posteriormente, a principios de los años 80, apareció el primer semillero profesional andaluz en la población de El Ejido, obteniendo gran auge durante los siguientes años, con producción de plantas en bloques de turba cultivados directamente sobre el suelo, pasando por la producción de plantas sobre contenedores multiloculares, principalmente sobre bandejas de distintos materiales y tamaños colocadas en mesas aisladas del suelo.

Este continuo avance y la especialización empresarial del sector semilleros, ha hecho posible la incorporación de nuevas tecnologías de producción y manejo, tales como: mejora de las estructuras, programadores de riego y clima, robots de riego y tratamientos fitosanitarios, robots de transporte interior, cámaras de germinación, etc. Así como el desarrollo de novedosas técnicas de cultivo, destacando los injertos en sus diferentes formas (aproximación, cuña lateral, púa, etc) sobre cultivos de sandía, melón y tomate.

Los semilleros hortícolas en su doble faceta de germinadores de semillas y productores de plántulas de calidad, son un eslabón esencial de la cadena productiva de cultivos intensivos, siendo esta trascendencia aún mayor en la horticultura de Almería debido a la magnitud de sus cifras productivas (Gázquez, 1996), reflejando el desarrollo paralelo de semilleros y cultivos protegidos.

2. LEGISLACIÓN PARA SEMILLEROS.

Independientemente de la legislación que regula la actividad del sector, se hará referencia a la legislación que existe para los sectores de materias primas o productos.

2.1. Semillas.

Las semillas hortícolas clasificadas como semillas de categoría “Standard” están reguladas por:

- Directiva 70/458/CEE del Consejo de 29 de septiembre de 1970, relativa a la comercialización de semillas hortícolas.
- Orden de 1 de julio de 1985 MAPA, por la que se aprueba el Reglamento técnico de Control y Certificación de semillas de Plantas Hortícolas
- Directiva 90/654/CEE del Consejo, (Diario oficial de las Comunidades Europeas nº L353 del 17-12-1990) que modifica la anterior Directiva 70/458/CEE, relativa a la Comercialización de semillas hortícolas de septiembre de 1970, relativa a la Comercialización de semillas hortícolas.

Dicha Directiva no especifica que se realicen controles sobre la calidad fitosanitaria de la semilla (virus, hongos o bacterias), siendo las propias productoras y/o comercializadoras las que garantizan una calidad “estándar” en términos de germinación y pureza, así como los tratamientos realizados de desinfección.

2.2. Substratos

La mayoría de los materiales utilizados como substratos para la germinación y desarrollo de las plántulas son turbas de importación, perlita, vermiculita, fibra de coco o bloques de lana de roca, sobre los cuales no existe un control de calidad y fitosanitario, y una legislación específica que regule dicho sector.

La normativa existente al respecto es muy escasa y poco clara:

- Normativa sobre Turbas y Substratos MAPA, 1987 (BOE nº 146 de 19-07-91)
- Real Decreto 2071/93, MAPA (BOE nº 300 de 16-12-93)

Los productos como: turbas, perlita, vermiculita, etc., se encuentran registrados por el MAPA en el Registro de Productos Fertilizantes y Afines.

2.3. Semilleros

Los semilleros hortícolas están regulados por una extensa y complicada normativa compuesta por: Directivas de la CEE, Reales Decretos y Órdenes del MAPA y Resoluciones de las distintas Consejerías Autónomas.

La legislación existente con sus normas más significativas es:

- Orden de 9 de Marzo de 1992 (BOE nº 66 del 17-03-92), por la que se establecen las bases fitosanitarias para la producción de plantales de hortalizas y material de reproducción de ornamentales.
- Resolución de 11 de Mayo de 1992, de la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la J. A. (BOJA nº 46 del 28-05-92), por la que se establecen

normas fitosanitarias para la producción de plántulas de hortalizas y material de reproducción de ornamentales.

- Directiva 92/33/CEE del Consejo, de 28 de Abril de 1992 (D.O.C.E. nº L157 del 10-06-92), relativa a la comercialización de plántulas de hortalizas y de materiales de multiplicación de hortalizas, distintos de las semillas.
- Orden de 17 de Mayo de 1993 MAPA, por la que se establecen las obligaciones y normas en relación con el Registro Oficial de Productores, Comerciantes e Importadores de vegetales, así como la normalización de los Pasaportes Fitosanitarios para la circulación de productos vegetales dentro de la Comunidad.
- Directiva 93/61/CEE de la Comisión, de 2 de Julio de 1993, por la que se establecen las fichas que contienen las condiciones que deben cumplir los plántulas y material de multiplicación de hortalizas, distintos de las semillas, de conformidad con la Directiva 92/33/CEE del Consejo.
- Directiva 93/62/CEE de la Comisión, de 5 de Julio de 1993, por la que se establecen las disposiciones de aplicación para la vigilancia y control de los proveedores y establecimientos, en el marco de la Directiva 92/33/CEE del Consejo.
- Orden de 28 de Octubre de 1994 (BOE nº 264 del 04-11-94), por la que se aprueba El Reglamento Técnico de Control de la Producción y Comercialización de Plántulas de Hortalizas y Material de Multiplicación de Hortalizas, distinto de las semillas.
- Orden de 12 de Diciembre de 2001 (BOJA nº 3 del 08-01-2002), por la que se establecen las medidas de control obligatorias así como las recomendadas en la lucha contra las enfermedades víricas en los cultivos hortícolas.

Las Directivas, Órdenes y Resoluciones afectan y obligan al sector semillero a cumplir lo siguiente:

I. Deberán estar inscritos en los siguientes registros:

- Registro Provisional de Productores de Plantas de Vivero.
- Registro Oficial de Productores, Comerciantes e Importadores de vegetales.
- Registro y Autorización para expedir Pasaportes Fitosanitarios
- Certificado de Autorización para la venta de Semillas y Plantas de Vivero.

II. Disponer de instalaciones adecuadas:

- Aislamiento general de las naves de producción.
- Vados Fitosanitarios. (Uso de batas y/o calzas desechables para visitas).
- Ventilaciones cubiertas con mallas antiparásitas de menos de 1 mm².
- Perímetro de naves cubierto con material impermeable de al menos 1 m de ancho.
- Instalación de desinfección de módulos, bandejas y material auxiliar.

- III. Utilizar semillas debidamente registradas y autorizadas.
- IV. Desinfección mínima dos veces al año de las instalaciones.
- V. Mantener al máximo higiene y limpieza en todo el proceso de producción, naves adyacentes y almacenes.
- VI. Mantener un Registro constante de las semillas sembradas (especie, variedad cantidad, nº lote, entidad productora), de al menos durante un año.
- VII. Llevar un Libro Registro de tratamiento fitosanitarios y abonados realizados manteniéndolo al menos durante un año.
- VIII. Adoptar las medidas necesarias que garanticen la calidad fitosanitaria de semillas, turbas, agua, bandejas y otros medios de producción. Informando de cualquier tipo de anomalía extraña que se presente.
- IX. Expedir el Pasaporte Fitosanitario de todas las plantas que salgan para su trasplante.
- X. Disponer de un Técnico Titulado, Responsable del Control Fitosanitario.

3. INSTALACIONES.

Las primeras instalaciones destinadas a semilleros eran prácticamente iguales a las de un invernadero tradicional, dependiendo de la zona; las mismas estructuras con acondicionamientos para el soporte de bandejas, un sistema de riego manual y la incorporación o no, de una simple máquina de siembra, eran suficientes para la producción de plantas.

Actualmente la exigencia de mayor calidad de plántulas, el alto coste de las semillas híbridas, la mano de obra, la producción estacional, la competencia del sector y la legislación existente, hacen necesario que la instalación o renovación de un semillero sea bien estudiado y proyectado, con la distribución y dependencias necesarias: (invernaderos, oficinas, salas de calefacción, almacén de manipulación, embalse y cabezal de riego, zonas de almacenamiento y desinfección, maquinaria necesaria, vehículos de transporte, etc.), realizando un análisis muy estricto y minucioso de los siguientes puntos:

a) Zona de producción

- Cultivos y épocas de trasplante.
- Volumen teórico de producción.
- Empresas del sector.
- Disponibilidad del factor humano.

b) Características de la finca

- Situación, Red viaria y comunicaciones.
- Superficie y Topografía.
- Suministro de Agua y su Calidad.
- Suministro de Energía Eléctrica y Telecomunicaciones.

c) Climatología de la zona

- Evolución de las temperaturas medias, extremas y estacionales.
- Evolución de la humedad relativa.
- Insolación real y potencial
- Duración del día.
- Pluviometría.
- Régimen de vientos dominantes e intensidad.

3.1. Invernaderos

Las estructuras de los invernaderos destinados a semilleros profesionales han ido avanzando a un ritmo espectacular. Las primeras estructuras tipo “parral” a dos aguas construidos de madera y alambre fueron acondicionadas para la producción de plantas; posteriormente estas mismas estructuras fueron mejoradas introduciendo en su construcción materiales más duraderos y de mayor calidad (tubos galvanizados y vigas o postes de hormigón) dándoles mayor altura y mejorando las ventilaciones laterales e introduciendo ventilaciones cenitales, así como la colocación de doble techo para amortiguar los extremos de temperatura y evitar la caída de agua directamente sobre las plantas “goteo” tan nefasto para las jóvenes plantas.

Actualmente el diseño de forma y dimensionado del invernadero “multitúnel o multicapilla” hace posible un aprovechamiento racional del terreno cubierto. La

facilidad de trabajo, unido a unas grandes posibilidades de aireación-ventilación, permite manejar más fácilmente los factores climáticos o microclima interior de forma manual o totalmente automática, todo ello sin perder robustez y seguridad, pero si consiguiendo unos niveles de estanqueidad y aislamiento altos.

Este tipo de estructuras precisan de una buena nivelación del terreno (muy importante también para la posterior colocación de las banquetas de cultivo o cajas directamente sobre el suelo) y una cimentación de los anclajes, en contrapartida su montaje es muy rápido. Dicha estructura esta realizada a partir de bandas de acero galvanizado, ya sea por procedimiento de galvanizado en caliente o sendzimir, según las piezas que la forman y de acuerdo a una normativa dictada al efecto. Las dimensiones de los módulos de los invernaderos multicapilla actuales y con independencia, según las marcas comerciales son:

- **Anchura:** múltiplos de 6,40-7,00-8,00-9,60-12,00 metros.
- **Longitud:** múltiplos de 2,00 -2,50 metros.
- **Altura bajo canal:** desde 2,80 hasta 4,50 metros.
- **Altura en cumbre:** desde 4,50 hasta 6,50 metros.

Las cubiertas de estos invernaderos de última generación, también han avanzado y mejorado; pasando de los filmes de PE normales, de duración dos campañas, a plásticos térmicos tricapa de duración tres-cuatro años, antigoteo y de gran capacidad térmica. La última tendencia es colocar doble cubierta en techo con cámara hinchable (mayor resistencia a vientos, cámara de aire reguladora de temperatura) y perímetros laterales con placa semirígida de materiales transparentes y más duraderos (PVC - Polimetacrilato- Policarbonato). Existen invernaderos de reciente construcción con cubierta rígida de cristal transparente, sobre estructuras multicapilla simple o doble.



FIGURA 2: Detalle colocación de bandejas en semillero



FIGURA 3: Detalle estructura tipo multitúnel en semillero FUENTE: Invernaderos el pilar.

3.2. Maquinaria de siembra

La maquinaria necesaria para realizar todo el proceso de siembra es:

- Sembradora de precisión o Tren de siembra
- Compresor de aire.
- Turbina de aspiración.
- Bomba de riego y dosificación.

Las sembradoras modernas están formadas por un conjunto de elementos mecánicos, eléctricos y electrónicos, que realizan simultáneamente todas las operaciones de siembra. Este conjunto está formado por los elementos siguientes:

- Mezclador de substratos. Consiste en una tolva de capacidad volumétrica de 500 a 1000 litros de substrato; tiene un molino mezclador mediante unas aspas accionadas por un motor eléctrico y un sinfín elevador que lleva la mezcla realizada (turba rubias, negras, perlita, fibra de coco, o vermiculita) hasta la tolva o modulo de llenado y prensado.
- Alimentador de bandejas. Elemento rectangular de dimensiones similares a la de las bandejas (50 x 70 cm) y con capacidad para 15-30 unidades. Posee un sensor electrónico que nos indica la existencia o no de bandejas; estas pasan al modulo de

llenado y prensado mediante el arrastre mecánico producido por un cilindro neumático o cadena, posicionando correctamente cada bandeja en el lugar y modulo exacto.

- Módulo de llenado y prensado. Módulo que varía en función del tipo de máquina, compuesto generalmente por un sinfín elevador que dosifica la cantidad de sustrato por bandeja; una tolva de recepción, debajo de la cual se sitúa la bandeja y unas aspas giratorias que van llenando y prensando el sustrato. Todo ello esta sincronizado y temporizado, movido por motores eléctricos y un cuadro de mandos.

- Módulo de punzonado. Consta de un puente mecánico sobre el que van instalados uno o dos cilindros neumáticos, que se unen a una plancha de aluminio de 1-2 cm de espesor y de iguales dimensiones a la de la bandeja. Esta plancha contiene en su parte inferior tantos conos invertidos como alveolos tenga la bandeja y en la misma disposición.

Al descender la plancha sobre la bandeja llena de sustrato (según las ordenes recibidas de los sensores de siembra), marca unas hendiduras de 1 a 2 cm de profundidad en cada alveolo, (profundidad regulable según la semilla a sembrar). Existen también las sembradoras de tambor donde el punzonado lo realiza un rodillo con conos invertidos, al avanzar la bandeja sobre el tren de siembra.

- Cabezal de siembra. Esta parte del tren de siembra es la que más modificaciones ha sufrido, siempre buscando mayores rendimientos y precisión. Se ha pasado de la siembra manual de los inicios, por las máquinas semiautomáticas de casetes, los cabezales semiautomáticos de librillo, hasta llegar a los modernos cabezales de siembra automáticos. Rendimientos de: 250-400 bandejas/hora.

Estos últimos constan de una parte fija llamada pulpo, formada por una placa superior perforada en forma de embudo que une mediante tubos de P.E. la placa inferior, donde cae la semilla y mediante una compuerta neumática que se abre deja la semilla en cada alveolo; y una parte móvil con depósito de semilla, placa perforada de aspiración, vibrador, peine de barrido y elemento de soplado de semilla, todo un complejo perfectamente armonizado y controlado por un autómata.

Las sembradoras de tambor son aptas para semillas redondas y partidas de semillas grandes, obteniéndose muy buenos rendimientos: 450-800 bandejas/hora.

- Módulo de tapado. Pequeña parte simple pero de gran importancia en el proceso de siembra. Está compuesto por una tolva de forma troncopiramidal que en el fondo lleva una apertura para dejar caer el material para cubrir las semillas sembradas (perlita o vermiculita). Su capacidad de 50-60 litros permite tapar entre 50-60 bandejas. Junto a la tolva lleva un raspador por su parte posterior que elimina el material sobrante, dejándolo caer sobre un depósito para recogerlo y reutilizarlo. El sistema puede ser temporizado y automático.

- Túnel de riego. Campana o túnel de 1-2 m (capacidad para 2-4 bandejas) que tiene instaladas en su techo 6-8-10 electroválvulas con sus correspondientes boquillas de riego de caudal 0,9-1,2 L/min/ud. El sistema lleva instalado un temporizador y un dosificador volumétrico que inyecta junto con el agua de riego el primer tratamiento fungicida de vital importancia, previo a la germinación.

- Apilador de bandejas. Conjunto de elementos electromecánicos que van recogiendo y agrupando las bandejas sembradas en torres de 8-10-12 uds según la cantidad deseada, y sacándolas sobre el carril de rodillos del final del tren, para su posterior paletizado y marcaje de partidas.

Todo el conjunto puede estar informatizado y robotizado. Los rendimientos de siembra deben de ser de: 250-400 bandejas/hora (2 operarios).

3.3. Cámara de germinación

Es un recinto cerrado de características similares a cualquier cámara frigorífica donde se introducen las bandejas sembradas y se mantienen durante un tiempo determinado en condiciones óptimas de germinación, manteniendo los parámetros necesarios, (temperatura y humedad relativa) para la germinación de las distintas especies de semilla (ver tablas de cultivo, cuadro nº 2) y obtener así el mayor porcentaje de estas, en plantas viables.

El dimensionamiento y capacidad de la cámara dependerá del volumen de producción previsto del semillero y de las especies a producir (cantidad de bandejas sembradas diarias y días necesarios de germinación).

Su construcción puede realizarse de obra civil recubierta de materiales termoaislantes o paneles prefabricados termoaislantes, constará de una o dos puertas, para entrada y salida. La maquinaria necesaria para mantener el microclima interior es: un equipo de aire acondicionado reversible (frío-calor), un equipo humidificador (fog-sistem), sondas de temperatura y de humedad relativa, cuadro de automatismos con termostato e higróstico de lectura y control.

3.4. Cámara de cultivo

Recinto de similares características a la cámara de germinación, normalmente de dimensiones más pequeñas. La gran diferencia está en la incorporación y control de un tercer parámetro: la luz. Su función es mantener constantes los parámetros de: temperatura, humedad relativa y luz, en condiciones ideales que favorezcan el enraizamiento de esquejes o prendimiento de injertos, ya que se trabaja con plantas vivas y no con semillas; llevando un seguimiento y control muy exhaustivo de los parámetros mencionados.

La colocación y disposición de las bandejas en la cámara también es distinta, estando aquí, sobre estanterías fijas o móviles con separación suficiente entre bandejas que permitan recibir las condiciones: temperatura, humedad y luz (artificial), de forma uniforme. La dimensión será la que permita introducir la producción de un solo día, para evitar abrir puertas y cambiar las condiciones una vez iniciado el proceso de enraizamiento o prendimiento. Se instalarán tantas cámaras como necesidades de producción se tengan.

3.5. Taller de injertos.

Es el lugar donde se realiza la técnica de injertado, manteniendo unas condiciones climáticas buenas, tanto para el personal que realiza dicha labor, como para las plantas a injertar. Según el método o tipo de injerto a realizar, consta de una gran mesa o varias mesas unitarias, en ellas se dispone de todo el material necesario para injertar: pinzas, bandas de estaño, bisturíes, cuchillas, etc. y se colocan las distintas plantas, tanto del patrón como de la variedad a injertar. Es imprescindible la instalación de luz artificial que facilite la visión de los injertadores, al ser un trabajo de gran precisión.

En esta fase se realiza una previa clasificación del material vegetal desde el punto de vista productivo del melón cumpliendo una serie de criterios que se han de tener en cuenta para elegir la variedad correcta:

- Exigencias de mercado de destino.
- Características de la variedad comercial: vigor de la planta, resistencias a plagas y enfermedades, calidad interna y externa del fruto, conversación.

3.5.1. Injertos.

Son plantas que han sido modificadas mediante la técnica de injertado permitiendo cultivar especies sensibles a ciertos patógenos, sobre suelos infectados, utilizando el sistema radicular de patrones resistentes y la parte aérea de la variedad.

Los portajinjertos o patrones utilizados deben cumplir las siguientes cualidades:

- Resistencia a la enfermedad limitante del cultivo.
- Resistencia o tolerancia a otros patógenos del suelo.
- Vigor y rusticidad.
- Gran afinidad con la variedad a injertar.
- Buenas características para realizar el injerto.
- No modificar la calidad externa e interna del fruto.

3.5.1.1. Tipos de injertos.

Los métodos de injertar o tipos de injerto sobre especies hortícolas pertenecientes a las familias de Cucurbitáceas y Solanáceas son:

- Injerto de aproximación
- Injerto de cuña.
- Injerto de empalme

El método más utilizado en el melón es el de aproximación, que si lo desean, se puede dejar a dos tallos. Esta técnica se utiliza fundamentalmente para evitar los problemas de *Fusarium*, Cribado y en algunas zonas por la alta salinidad del agua de riego.

Para obtener éxito en la técnica de injertado, debemos tener presente:

- Orden o formación de la siembra del patrón y la variedad.
- Extremar los cuidados durante el injertado y periodo de prendimiento.
- Controlar el desarrollo del crecimiento.

3.6. Banquetas de cultivo

Las banquetas o mesas de cultivo, son estructuras construidas dentro del invernadero, a una determinada altura del suelo (50-70 cm), perfectamente niveladas, donde se colocan las bandejas extendidas, ya pregerminadas, recibiendo las labores y tratamientos necesarios para terminar su ciclo de crecimiento hasta el momento adecuado de su trasplante.

Existen varias formas de construir y disponer las mesas, dependiendo de su coste, pasillos interiores, etc., enumerando las siguientes: estructura de alambre galvanizado montado sobre tubos galvanizados; tubos galvanizados horizontales montados sobre tubos verticales; viguetas de hormigón montados sobre bloques directamente o sobre postes de hormigón; perfiles de galvanizado montados sobre postes de hormigón, perfiles de PVC reforzado, montado sobre postes de hormigón, PVC o bloques. De todos ellos, los más utilizados son los dos últimos. La existencia de banquetas de cultivos, obedece a una serie de ventajas frente a colocar y extender las bandejas en el suelo; estas son:

- Fácil manipulación de bandejas.
- No hay riesgo de encharcamiento.
- Mayor aireación.
- Facilidad de instalar mangueras de calefacción (aire o agua).
- Rapidez en la localización de partidas.
- Mayor comodidad y rendimiento de trabajo.



FIGURA: 4. Detalle de banqueta de cultivo. FUENTE: Horticom.

3.7. Sistemas de riego

El riego de un semillero tiene prácticamente la misma configuración que una explotación hortícola y ornamental, estando formado por las siguientes unidades básicas: embalse, cabezal de riego, red de alimentación y sistema de distribución del agua. El sistema o forma de distribución del agua de riego será el que nos definirá el llamado “sistema de riego”, encontrando grandes diferencias de uno a otro sistema (riego por inundación, goteo, aspersión, microaspersión, etc).

Básicamente y dada la alta densidad de plantas por metro cuadrado, las formas más comunes de distribuir el agua en cualquier semillero se puede catalogar en dos:

- “sistema de inundación”
- “sistema de microaspersión”

Con las variantes siguientes:

- Riego manual (con manguera). Sistema manual tradicional, e imprescindible y complementario con cualquier otro sistema, la eficacia y éxito depende exclusivamente de la persona o personas que lo realizan.
- Microaspersión fija. Sistema formado por un conjunto de tuberías generales, ramales portaaspersores y microaspersores, dispuestos al marco necesario, según características del fabricante (alcance, caudal, etc.) y colocados hacia arriba o hacia abajo sin producir goteos perjudiciales.
- Trenes de riego. Consiste en una barra pulverizadora transversal que se desplaza longitudinalmente mediante unas ruedas sobre un raíl colgado de la estructura del invernadero, accionado por un motorreductor eléctrico, dos poleas y un cable de tracción. La barra pulverizadora está compuesta por un tubo de PVC y un conjunto de boquillas pulverizadoras antigoteo instaladas cada 25-50 cm, unido todo ello a un perfil de aluminio y al cuadro de mandos. El conjunto dispone de sensores que accionan la barra pulverizadora, mediante la colocación de electroimanes y electroválvulas, realizando una distribución uniforme del agua de riego.
- Riego por inundación. (flujo-reflujo). Sistema de gran caudal, con recogida de la solución nutritiva. Instalación pensada para cultivos hidropónicos.

3.8. Sistemas de tratamientos fitosanitarios

Independientemente de adoptar todas las medidas profilácticas, medidas culturales y métodos de barrera de prevención, se hace necesaria la implantación de un programa de tratamientos fitosanitarios capaz de conseguir y mantener la sanidad y calidad fitosanitaria de las plántulas. Para ello se dispone de sistemas de tratamientos fitosanitarios, que utilizados solos o conjuntamente nos garanticen la obtención de plantas sanas y vigorosas; estos son:

➤ Inyección proporcional. La instalación de uno o varios depósitos de mezclas, y su bomba de inyección correspondiente, son los elementos necesarios para incorporar los productos fungicidas y/o insecticidas en la red de riego para su distribución.

➤ Pulverización de alto volumen. Sistema tradicional más o menos sofisticado, presente en todas las instalaciones; compuesto por: depósito de mezclas, motobomba de presión y red de distribución. La aplicación se realiza con pistoletas de diversas formas y tipos de gota, de alto volumen, pulverizando directamente sobre las plantas cultivadas.

➤ Nebulización de ultrabajo volumen. Los productos fitosanitarios diluidos en un pequeño volumen de agua son distribuidos con una boquilla de alta presión, produciendo una finísima niebla, que uno o varios ventiladores reparten por todo el volumen del invernadero. Son tratamientos generales no localizados, de alta eficacia, permitiendo su programación fuera del horario de trabajo y con el invernadero herméticamente cerrado. El sistema dispone de mecanismos como: autolimpieza de boquillas, preventilación, removedor y detector final del producto.

3.9. Climatización

La correcta interpretación y manipulación de los siguientes parámetros: luz, temperatura y humedad, tanto externa como interna, nos darán las condiciones deseadas para la producción de plántulas; teniendo muy en cuenta que una ligera modificación de cualquiera de ellos, influye directamente y afecta a todos los demás.

El acondicionamiento del microclima interior de las instalaciones hay que diferenciarlo en dos grandes periodos, en nuestra zona de producción (Costa Almería) y estos coinciden con ciclos de producción de plantas distintos:

A. Periodos cálidos: primavera -verano (abril - septiembre).

B. Periodos fríos: otoño - invierno (octubre - marzo).

A. Periodos cálidos.

La gran radiación solar recibida y las altas temperaturas alcanzadas, hacen difícil obtener los rangos óptimos de los parámetros de producción, siendo la disminución de temperatura el mayor problema de estos periodos, que resolveremos utilizando conjuntamente las técnicas siguientes:

A.1. Reducción de radiación solar. Aplicando métodos de sombreado, sobre la cubierta del invernadero, que pueden ser: Estáticos (encalado de cubierta o colocación de mallas) o dinámicos (instalación de pantallas de sombreado o aluminizadas, colocadas en interior o exterior).

A.2. Ventilación. Ventilación pasiva: Instalación de ventanas cenitales en todas las cubiertas o laterales. Ventilación activa con la incorporación de ventiladores para recirculación interna del aire, y extractores laterales.

A.3. Refrigeración por agua. Instalación de sistemas para enfriar el aire:

- Ventiladores-Nebulizadores de media presión.
- Fog-System: nebulización a alta presión.
- Cooling-System: paneles húmedos y extractores de aire.

B. Periodos fríos

La baja iluminación y mantener la temperatura nocturna y diurna en unos niveles óptimos para el desarrollo de las plántulas, se consigue con una buena hermeticidad del invernadero, instalación de doble cámara y el apoyo de un sistema de calefacción.

B.1. Calefacción. Dependiendo de las exigencias del cultivo se instalarán sistemas de calefacción por aire o agua, teniendo presente que la instalación sea capaz de mantener uniforme y constante la temperatura mínima prefijada, fiable y segura.

B.2. Sistemas de aire: generadores con quemador de combustible, cámara de combustión, ventilador o turbina de impulsión, distribuyendo el aire caliente.

B.3. Sistemas de agua: caldera, quemador de combustible, colector, bombas de impulsión, tuberías generales de impulsión y retorno, tuberías de distribución y tubos de emisión calorífica (lisos, corrugados, aluminio, acero), formando un circuito cerrado.

4. MATERIALES.

Los distintos materiales y materias primas necesarias para realizar la transformación del material base “la semilla” en plantas óptimas para su trasplante lo componen: substratos, bandejas, fundas y otros materiales accesorios.

4.1. Substratos

Dependiendo del tipo de suelo de cultivo final de la planta, se utilizarán substratos a base de: turba, perlita, termita, fibra de coco, lana de roca o la mezcla entre ellos. La elección de cualquier sustrato debe cumplir las siguientes propiedades:

- Libre de patógenos y gérmenes.
- Excelente porosidad, permitiendo gran aireación y capacidad de retención.
- pH regulado y adecuado a los cultivos.
- Elevada capacidad de intercambio iónico.
- Baja salinidad.
- Estabilidad de la estructura.

El material más utilizado son las turbas, y sus mezclas varían según los cultivos y la época de producción, diferenciando principalmente y a título orientativo:

- Campaña de invierno; mezcla compuesta por:
 - Turba rubia: 80-90%
 - Turba negra-parda: 10-20%
 - Perlita gruesa: 10-15%
- Campaña de verano; mezcla compuesta por:
 - Turba rubia: 60-70%
 - Turba negra-parda: 30-40%
 - Perlita gruesa: 15-20%

El porcentaje de mezcla de los distintos materiales es orientativa y oscilará según el tipo de alveolo, sistema de riego, planta a producir, a criterio de la dirección técnica.

4.2. Bandejas y fundas

Las bandejas son el soporte necesario para el cultivo en semillero. Normalmente se utilizan bandejas de poliestireno expandido (porespam) de color blanco, con un número determinado de alvéolos, maceteros de plástico y en menor medida tacos de turba prensada.

El tipo de alvéolo depende de la planta a sembrar de forma y el tamaño de su sistema radicular, así como las limitaciones del tiempo y el espacio disponible en el semillero. Por tanto su tamaño está directamente relacionado con el control del crecimiento de la planta (Wien, 1997) siendo otro factor que interviene en la calidad de la plántula.

4.3. Otros materiales

El semillero deberá estar dotado además de los siguientes materiales:

- Envases de cartón, plástico y bolsas de plástico para embalajes.
- Tablillas identificativas.
- Fertilizantes y productos nutricionales.
- Productos fitosanitarios.

5. CULTIVOS.

El semillero profesional como especialista en su sector, puede realizar el cultivo de cualquier especie hortícola solicitada por sus clientes horticultores. Centrándose en la zona del litoral mediterráneo, las principales especies cultivadas son: pimiento, tomate, berenjena, melón, sandía, injertos de: sandía, melón, pepino y tomate, lechuga, col china, coliflor, brócoli, apio, etc., distinguiendo dos campañas anuales de producción muy diferenciadas, sobre todo en la horticultura intensiva almeriense.

Los porcentajes de siembra de las especies varían anualmente de unas zonas a otras.

Los cuadros I, II, III reflejan algunos datos de interés de las especies más cultivadas.

Especies	Tª mínima °C		Tª óptima °C			Tª germin. °C		Tª maxim °C		Humedad relativa
	Letal	Biológica	Día	Noche	Subst.	Mínim.	Óptim.	Días	Días	
Pimiento	0 / 4	10 - 12	22 - 28	16 - 18	15 - 20	12 - 15	25 - 30	28 - 32	65 - 70	
Tomate	0 / 2	8 - 10	22 - 26	13 - 16	15 - 20	9 - 10	25 - 30	26 - 30	55 - 60	
Berenjena	0 / 2	9 - 10	22 - 26	15 - 18	12 - 18	13 - 15	25 - 30	30 - 32	65 - 70	
Col china	0 / 5	3 - 5	17 - 20	12 - 15	15 - 20	8 - 10	15 - 25	30 - 32	65 - 70	
Melón	0 / 2	12 - 14	24 - 30	18 - 21	20 - 22	10 - 13	20 - 30	30 - 34	70 - 90	
Sandía	0 / 2	10 - 13	24 - 30	18 - 21	20 - 21	10 - 12	20 - 30	30 - 34	65 - 75	
Injertos	0 / 2	10 - 13	24 - 30	20 - 25	20 - 25	--	25 - 30	30 - 35	85 - 90	

CUADRO 1: Temperaturas óptimas de las especies más cultivadas.

Fuente: Camacho F., 2003

Cultivos	Cámara germinación			Germinación	Nascencia	1ª hoja Verdadera	Transplante
	Horas	Tª °C	H.R. %	Horas	Días	Días	Días
Pimiento	120	25	75	120	7	16 - 19	32 - 45
Tomate otoño	48	25	85	72	4	16 - 18	30 - 35
Tomate primav.	48	25	85	72	4	12 - 15	25 - 30
Berenjena	72	25	85	72	4	15 - 17	25 - 35
Col china	--	--	--	24	2	7 - 10	25 - 35
Lechuga	30	14	90	24	2	6 - 7	20 - 25
Melón	72	25	85	48	3	15 - 18	25 - 35
Sandía	96	25	85	72	4	16 - 18	35 - 45

Cuadro 2: Periodos de tiempo necesarios para las especies más cultivadas.

Fuente: Camacho F., 2003.

Cultivos	Nº semillas	Profundidad	Semilla	Germinación	Plantas
	Gramo	cm.	Ha (gr)	%	Ha
Pimiento	120 - 150	0,5 - 1	0,2	80 - 95	20000 - 30000
Tomate	250 - 300	0,5 - 0,75	0,09	75 - 90	15000 - 25000
Berenjena	200 - 250	0,5 - 1	0,1 - 0,2	80 - 95	5000 - 7500
Col china	250 - 400	0,5	0,3	90 - 95	20000 - 30000
Lechuga	600 -1200	0,3	0,1	90 - 95	80000 - 100000
Melón	25 - 30	1 - 1,5	0,5	85 - 95	5000 - 10000
Sandía	15 - 25	1 - 1,5	0,25	75 - 90	2500 - 7500

*Cuadro 3: características de las especies más cultivadas.
Fuente: Camacho F., 2003*

a. Campaña de primavera-verano. Se realizan básicamente seis especies, con sus diferentes tipos de cultivos y multitud de variedades: pimiento, tomate, berenjena, pepino, calabacín y judía verde.

b. Campaña de otoño-invierno. Las principales especies más cultivadas son: tomate, pepino, melón, sandía, sandía injertada y col china.

6. LABORES DE CULTIVO.

Las operaciones o labores de cultivo que se realizan durante el proceso del semillero son varias, todas ellas de vital importancia y correctamente coordinadas. Debido a tener un ciclo de cultivo relativamente corto (normalmente 30-35 días, con un máximo de 50-60 días), las operaciones se han de realizar en el momento adecuado, teniendo poco margen para corregir posibles errores.

Destacaremos los trabajos más imprescindibles, siendo éstos los siguientes:

- Riego.
- Fertilización.
- Tratamientos fitosanitarios.

6.1. Riego

Esta operación quizás sea la más complicada de definir y cuantificar; ya que no existe norma exacta, en cuanto a cantidad y frecuencia de riegos, que se han de aplicar a las plantas, porque éstos dependerán de muchos factores: especies de cultivo (incluso variedades), estado fenológico, época de siembra, tipo de bandeja, mezcla de sustrato, condiciones climatológicas, sistema de riego, tipo de estructura, etc.

Se aplicaran los riegos necesarios, en cantidad y frecuencia según criterio del Técnico de explotación, evitando en cualquier caso los encharcamientos, tan nefastos, para las pequeñas plantas, así como las posibles deficiencias.

A modo de orientación, se aconsejará regar diariamente en primavera y verano (evitar realizar los riegos en las horas de mayor insolación y temperatura), y cada dos-tres días en invierno, procurando regar siempre por las mañanas.

6.2. Tratamientos fitosanitarios

Los tratamientos fitosanitarios comienzan desde el momento de siembra, con la incorporación del primer tratamiento fungicida en el agua de riego. El planteamiento y la programación de un calendario de tratamientos, será la forma más eficaz de combatir las plagas o enfermedades que atacan a las plántulas, en cada uno de sus estados de desarrollo en semillero.

Estos estados a los que hacemos referencia son: estado de dos cotiledones, estado de 1-2 hojas verdaderas, estado de 3-4 hojas, estado de planta desarrollada, estado planta adulta.

La realización de los tratamientos debe hacerse siempre de forma preventiva, evitando grandes infecciones de difícil curación; para ello debemos conocer los patógenos que atacan a los cultivos en sus diferentes épocas.

6.2.1. Campaña de Primavera-Verano.

La incidencia de plagas es muy superior al de enfermedades, ya sean aéreas o de raíz-cuello, además no solamente por el daño directo que realicen sobre las plantas sino por la posibilidad de transmisión y contagio de ciertas virosis de gran importancia de daños.

Plagas. Las principales son: Trips, Submarino, Mosca blanca, Orugas y Gusanos de suelo. Todos ellos se combaten con productos específicos existentes en el mercado o con mezclas entre ellos siempre teniendo en cuenta que estamos manipulando plántulas, donde las mezclas, dosis, etc., pueden ser citotóxicas.

Enfermedades. Las principales son: Pythium, Rizoctonia, Botritis y Bacteriosis.

6.2.2. Campaña de Otoño-Invierno.

Al contrario que en primavera-verano, la incidencia de plagas es menor debido a que las condiciones climatológicas son adversas para su desarrollo, pero si muy favorables para el desarrollo de diversos hongos que provocan ciertas enfermedades, algunas de gran importancia por los daños causados.

- Plagas. Las principales son: Mosca blanca, Trips.
- Enfermedades raíz-cuello. Tenemos: Pythium, Rizoctonia.
- Enfermedades aéreas. Mildiu, Oidio, Botritis, Mycosphaerella y Alternaria.

Los tratamientos fitosanitarios se realizarán a última hora del día para evitar fitotoxicidad, la mayoría de ellos serán de carácter general para todos los cultivos existentes y otros de carácter específico, contra alguna plaga o enfermedad de un determinado cultivo, siempre con productos registrados y autorizados.

7. PROCESO DE PRODUCCIÓN.

El objetivo de cualquier semillero hortícola es conseguir plantas de gran calidad:

- Sanas
- Ricas en materia seca
- Compactas
- Homogéneas
- Buena relación tallo/raíz

Para conseguirlo deberemos seguir y controlar cada paso de proceso productivo:

- **Recepción correcta de semilla.**
 - **Datos del cliente:** Razón social, CIF, domicilio y teléfono.
 - **Datos de semilla:** Especie, variedad, nº de lote, cantidad, fecha de siembra o trasplante, productor y tipo de bandeja.
- **Registro de siembra.**

Realizar el programa de siembra diario, según especies y variedades iguales y tipo de bandejas; numerando las distintas partidas, este proceso normalmente lo realiza el sistema informático automáticamente.
- **Siembra.**
 - Comprobación completa del tren de siembra.
 - Realizar las mezclas de sustrato adecuadas, homogéneas, con un llenado y prensado de cepellones uniforme.
 - Punzonado centrado y profundidad deseada.
 - Siembra completa sin fallos ni alveolos dobles.
 - Tapado de semilla y raspado posterior.
 - Riego regular y uniforme (de vital importancia) incorporando 1^{er} tratamiento fungicida (Previcur 1 cc/L = 3 cc/m² de pc).
- **Paletizado y control de partidas.**
 - Recogiendo las bandejas sembradas (bloques de 5-10 unidades) se paletizan, tapándose unas con otras evitando resecciones, terminado el palet (80-100 ud) se tapan las últimas bandejas sembradas, con bandejas vacías.
 - Marcaje de todas las partidas con datos donde aparezca el nº de partida, la cantidad de bandejas sembradas, fecha de siembra así como la especie. Esta información estará detallada en tablillas localizadas en cada una de las partidas, además hay que realizar un recuento perfecto de unidades sembradas, comprobación y anotación en partes de siembra.

➤ **Cámara de germinación.**

Se introducen los palets inmediatamente después de la siembra en cámara con las condiciones ideales.

Las condiciones generales para que las semillas germinen son:

- TEMPERATURA: 25 - 27 °C.
- HUMEDAD RELATIVA: 80 - 90%

➤ **Control de la fertirrigación.**

Se programa el riego según sus necesidades, previa observación al plantel, controlando el pH (6-6,5) y la CE (agua + 1-1,5 puntos en dS/m).

Se recomienda regar a primera hora de la mañana y realizar un repaso de orillas y fallos a primera hora de la tarde.

➤ **Tratamientos fitosanitarios.**

Realizar un programa de tratamientos semanal, incidiendo sobre los patógenos más activos o difícil de combatir, ya sean insectos, hongos o bacterias.

Tratar siempre que sea posible por la tarde a última hora.

➤ **Control de salida y expedición.**

Comprobación el estado fenológico y sanitario de la planta a su salida. Así como expedirla adecuadamente con su embalaje y protección necesaria.

La constante vigilancia de los distintos módulos de cultivo del invernadero y el control de sus parámetros climáticos: luz, temperatura y humedad; el orden y limpieza; el control de la fertirrigación, la observación diaria de las plántulas (sistema radicular, longitud de entrenudos, tamaño de hoja, color de la misma, incidencia o presencia de plagas o enfermedades); y la realización de tratamientos fitosanitarios adecuados, nos darán como resultado una planta con gran calidad y garantía fitosanitaria.

8. VENTAJAS QUE PROPORCIONAN LOS SEMILLEROS.

La obtención de plántulas en semilleros, especialmente de aquellas variedades hortícolas que se van a cultivar en invernaderos, trae consigo una serie de ventajas que a continuación se expresan por su importancia:

- ❖ Se puede efectuar la siembra en semillero sin haberse preparado el terreno de asiento.
- ❖ La planta germina sin dificultad en el semillero y se desarrolla en un medio adecuado a sus necesidades (temperatura y humedad).
- ❖ Puede ser controlado su crecimiento, por tratarse de superficies reducidas.
- ❖ El riesgo se efectúa más fácilmente de acuerdo con sus exigencias.
- ❖ Las pérdidas por plagas y enfermedades son menos frecuentes por permitir controlarlas sin ninguna dificultad.
- ❖ Para la reposición de “fallos” sobre el terreno de asiento, se dispone de plantas de igual desarrollo.
- ❖ Mayor rentabilidad del terreno de asiento, al permitir su explotación mediante otro cultivo, al tiempo que las primeras fases del crecimiento de un nuevo cultivo se va desarrollando en el semillero.
- ❖ Mayor precocidad de frutos al permitir el semillero el desarrollo de las plantas, pues de efectuarse sobre el terreno de asiento, se tendrá que realizar en épocas más tardías libres de heladas.

8.1. Normas generales para una buena germinación

Para conseguir la mejor germinación de las semillas, tenemos que tener en cuenta una serie de nociones.

La semilla ha de estar limpia, sin restos de frutos, ya que estos actúan como inhibidores de la germinación. Eliminar latencias dando frío (rompe la latencia interna) y el estratificado lo que hace es mantener húmeda la cáscara para favorecer la penetración de la humedad hasta el embrión, para ellos se mantienen en cámara de germinación 24 horas, después de la siembra.

8.2. Tiempo en semillero.

Este tiempo, es el tiempo que tardará la planta en estar lista para el trasplante. Se debe prestar especial cuidado a dicho tiempo, ya que trasplantar una planta pasada o demasiado pequeña será el inicio de una serie de problemas en el cultivo que tendrá difícil solución.

El tiempo que pasa de una planta en el semillero depende en su mayor parte de las condiciones climáticas. Para cada especie, el tiempo que transcurre es diferente, para el melón (*Cucumis melo*) sería:

FECHA SIEMBRA	DIAS PARA EL TRANSPLANTE
1-15 noviembre	41-45
15-30 noviembre	41-45
1-15 diciembre	44-48
15-31 diciembre	48-52
1-15 enero	48-52
15-31 enero	43-47
1-15 febrero	38-42
15-28 febrero	33-37

CUADRO 4: Posibles fechas de siembra para melón y tiempo en semillero

9. DESARROLLO DE PLÁNTULAS.

En la producción de plántulas se requiere atender a todos los detalles desde la siembra hasta la retirada para el trasplante. Para ello, el desarrollo se divide en cuatro etapas:

- Etapa 1. Comprende al periodo que transcurre entre la siembra y la emergencia de la radícula a través de la cubierta de la semilla. En esta etapa se requieren niveles altos de humedad y oxígeno alrededor de la semilla, abarca los procesos de germinación fisiológica y se desarrolla normalmente en el interior del sustrato, por lo que es difícilmente controlable.
- Etapa 2: es el periodo entre la emergencia de la radícula que penetra en el suelo o sustrato y la emergencia del hipocotilo (tallo) y las hojas de los cotiledones. Durante esta etapa aumentan las necesidades de oxígeno de la raíz y, por tanto debe disminuirse la cantidad de humedad suministrada. Comienza con la emergencia visible del vástago de la plántula y termina con la expansión total de las hojas cotiledóneas.
- Etapa 3: es el periodo de crecimiento y desarrollo de las hojas verdaderas. Demanda un abastecimiento adecuado de nutrientes, de humedad y la regulación de los factores de crecimiento. La duración de esta etapa es variable para las diferentes especies y está condicionada por el nivel de diferenciación vegetativa en que se realice el trasplante.
- Etapa 4: esta etapa corresponde al periodo previo al trasplante. Incluye condiciones adecuadas para el almacenamiento o mantenimiento de las plántulas en el semillero. Tiene una duración variable en función de la programación y necesidades del agricultor, y frecuentemente es el momento en el que se efectúa el acondicionamiento y endurecimiento de las plántulas.

Las etapas 1 y 2 son las más críticas, dependiendo fundamentalmente de las condiciones dadas de humedad y luminosidad, mientras en las etapas 3 y 4 se actúa para efectuar un acondicionamiento nutritivo que permita modificar y controlar los patrones de diferenciación y crecimiento de las plántulas y condicionar su respuesta al estrés post-trasplante.

9.1. Acondicionamiento y control.

Es posible regular la velocidad de crecimiento de las plántulas en semillero regulando la concentración de nitrógeno y otros nutrientes en el sustrato de cultivo. Se han sugerido dos formas de nutrición.

- La primera forma, se mantiene baja la velocidad de crecimiento con niveles bajos de nitrógeno, incrementando estos antes del trasplante.
- La segunda forma, la más utilizada, se centra en los niveles adecuados de nutrientes durante el crecimiento temprano de las plántulas y su disminución antes del trasplante. La disminución de los valores de nitrógeno ha de ser paulatina para que no decrezca la velocidad de crecimiento post-trasplante, ni en la posterior cosecha.

10. ENFERMEDADES DE LOS SEMILLEROS.

En general, se conocen como enfermedades de semillero a distintas patologías que tiene como característica común el presentarse en los primeros estados del desarrollo de la planta ocasionando la muerte o caída de las plántulas (*damping-off*) o dando lugar a plantas de escaso desarrollo y nulo valor comercial (Avilés, *et al* 2002).

Pero los semilleros necesitan consideraciones específicas que atañen a todo el proceso productivo. Así, las semillas de las solanáceas pueden ser portadoras de diferentes patógenos, algunos de difícil control. Patógenos, por otro lado, que puede no manifestarse durante el tiempo que permanecen las plántulas en las almácigas (semillero).

Esto nos permite dar entrada a la especial sensibilidad que atañe a las solanáceas, en especial a pepinos, melones y sandías que sufren los daños causados por ciertos hongos típicos de los semilleros. *Pythium* y *Rhizoctonia solani*.

- ❖ *Pythium aphanidermatum*, en los cultivos de pepino es un patógeno que marchita a las plantas en el semillero y en el terreno de asiento, cuando aquellas están en plena producción. Esta especie solo presenta estas características durante las épocas cálidas. Mientras que *P. irregulare* las realiza en las épocas frías.
- ❖ *Rhizoctonia solani* causa enfermedad y muerte sobre plántulas y plantas en plena producción de pepino y melón. Tanto *Pythium* y *Rhizoctonia* son transportados por turbas, agua de riego y por las masas de polvo que el aire mueve.

En el caso de las solanáceas son señeros los ejemplos que proporcionan algunas bacterias *Clavibacter michiganensis* spp *michiganensis* entre otras y ciertos virus como es el caso del mosaico del tomate, TMV; moteado suave del pimiento, PMMV; portados por las simientes y cuya manifestación sintomatológica ocurre en pleno cultivo.

Obviamente, este problema tiene dimensiones diferentes cuando el semillero es individual, hecho por cada agricultor, o las plantas se producen en grandes explotaciones, denominadas legalmente planteles.

En un plantel para solanáceas, hay que considerar, por lo tanto una serie de vías de entrada de patógenos establecidos o no en la zona donde aquel esté situado. Son de obligado cumplimiento la instalación de mallas para evitar la entrada de insectos transmisores de virus. Ejemplos de estos vectores son *Frankliniella occidentalis* y *Bemisia tabaci*.

Otro aspecto a tener en cuenta son las turbas y sustratos, componentes esenciales en el establecimiento de un semillero. Su sanidad no está garantizada y algunos patógenos pueden ser introducidos a través de este medio.

Con una importancia secundaria se han considerado el agua de riego y los vientos pero ambas vías son, sin duda el vehículo tanto de patógenos de la parte aérea

siendo el caso de *Botrytis cinérea* y varias especies causantes de oídio como de hongos típicamente telúricos *Fusarium oxysporum fsp lycopersici*.

Tanto en semilleros como en siembras directas, siguen teniendo una clara relevancia *Pythium* y *Rhizoctonia solani*. Para su control, se recomienda mediante desinfecciones de la cama de siembra, deberá ser apoyado con fungicidas específicos bien aplicados a la semilla antes de sembrar o al pie de las plántulas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. EMPLAZAMIENTO DEL ENSAYO.

1.1. UBICACIÓN DEL SEMILLERO.

Este ensayo ha sido realizado gracias al aporte de material vegetal cedido por el Semillero El Plantel, delegación en la Mojonera, situado en la Carretera de Las Norias, Nº 15 (paraje de Las Cámaras) perteneciente al término municipal La Mojonera de Almería.

Contando además con las delegaciones de San Agustín en El Ejido, así como en los términos de Dalias y Berja.



FIGURA 5: Localización de El Plantel semilleros.

1.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMILLERO.

El Plantel Semilleros produce anualmente unos 30 millones de plantas, dentro de los cuales cobra mayor importancia la producción de pimiento y de injertos de tomates, siendo uno de los semilleros la referencia de la provincia en estas áreas de producción.

Además, se producen otras variedades hortícolas como pepinos (*Cucumis sativus*), judías (*Phaseolus vulgaris* L), berenjenas (*Solanum melongena* L), sandías (*Citrulluslanatus* (Thunb)), melones (*Cucumis melo*),... y plantas ornamentales como son los geranios (*Pelargonium*) y poinsetias (*Euphorbia pulcherrima*)....

El Plantel ofrece sus centros equipados con la tecnología necesaria para garantizar el control de las condiciones climáticas.

Del equipamiento de los invernaderos destaca es especialmente el empleo de trenes de riego completamente informatizados, con los que se consigue un elevado

grado de uniformidad a la hora del riego, ya que garantiza el reparto homogéneo del agua por toda la bandeja.

Unos de los éxitos que caracteriza al semillero es la técnica de germinación, ya que han conseguido uno de los índices de aprovechamiento de la planta útil más significativos de Almería.

Actualmente disponen de tres cámaras de germinación apropiadas para cada tipo de cultivo y que precisaron en su momento de una importante inversión económica.

1.2.1. Exportación e importación

La mayoría de los clientes de El Plantel Semilleros ejercen su actividad en la zona del poniente almeriense. Sin embargo, gracias a su trayectoria, ha conseguido ya clientes por toda la provincia y en regiones vecinas, como pueden ser Murcia y Granada.

1.2.2. Sistema de riego.

El sistema de riego está compuesto por un cabezal dotado de un equipo de riego que nos permite dosificar perfectamente los fertilizantes.

Asimismo consta de trenes de riego, este sistema es hoy por hoy el sistema de riego que mejor se adapta a los semilleros permitiendo un ahorro en mano de obra y una mayor eficacia y uniformidad de las partidas si lo comparamos con los métodos tradicionales de riego con manguera y riego por aspersión.



FIGURA 6: Tren de riego automático, Semillero el Plantel.

1.2.3. Siembra

Las instalaciones del semillero disponen de dos equipos de siembra automáticos con distintos cabezales, los cuales permiten utilizar todo tipo de bandejas. Siendo este equipo de siembra uno de los más eficaces en el sector de semilleros hortícolas.



FIGURA 7: Equipos de siembra.

1.2.4. Tipos de sustratos.

Los sustratos que este semillero ofrece a sus clientes son:

- Turba
- Perlita
- Fibra de coco
- Perlita
- Lana de roca

A su vez, el cliente podrá decidir el tipo de bandeja que desea para el cultivo de su planta.



FIGURA 8: Sustratos utilizados por El Plantel Semilleros.

1.2.5. Clima.

Para la consecución de un clima idóneo tanto en la germinación como en la crianza de la planta, disponen de cámaras de germinación y cultivo especiales y de sistemas de calefacción y ventilación.

2. MATERIAL VEGETAL.

La especie utilizada en este ensayo ha sido *Cucumis melo* L., el tipo de material vegetal usado fue melón tipo Piel de sapo. Se usó la variedad Ricura que se trata de una planta de vigor medio sin dificultades para el cuaje. Su fruto es oval bien conformado, algo rugoso y escriturado longitudinal. El calibre oscila entre 1,8 y 2,2 Kg durante todo el ciclo. Presenta buen comportamiento para plantaciones tardías al aire libre. (www.rijkzwaan.es, 2011.)



*FIGURA 9: Fruto de melón cv. Ricura .Fuente:
http://www.ruralcaja.org/descarga/portainj_melon.pdf*

3. MÉTODO EXPERIMENTAL.

Dicho método se puede separar en dos partes;

- La primera de análisis a las plántulas así como a los daños que presentan junto con un análisis de las semillas utilizadas para este cultivo melón Ricura. Todo el material con el que se trabajó en la investigación fue cedido por El Plantel Semilleros.
- Una segunda parte en la cual se estudiaron los resultados obtenidos del material utilizado de ensayo, así como la identificación de hongos y bacterias, realizando para dicho fin técnicas como PCR, y la utilización de kits comerciales para extraer el DNA de la bacteria resultante.

3.1. ANÁLISIS DE PLÁNTULAS Y SEMILLAS

3.1.1. Análisis de plántulas.

3.1.1.1. Selección del material vegetal.

Una vez realizada la visita al semillero para comprobar el estado de las plántulas de melón, se inició una selección al azar del material vegetal en diferentes estados fenológicos, estos estados fenológicos abarcan desde plántulas que contienen solo sus cotiledones hasta plántulas que constan con 5 a 6 hojas verdaderas, mostrando cada una de ellas diferente grado de marchitez. Las plántulas seleccionadas se encontraban en distintas localizaciones en las bandejas de soporte, tanto en el centro de las mesas, como en sus extremos, comprobando así, si existe mayor gravedad debido a la acción del riego.

Una vez seleccionadas las plantas objeto para el estudio, se agruparon en una nueva bandeja para ser trasladadas al laboratorio 2.29 de la Escuela Superior de Ingeniería.

3.1.1.2. Estudio de las plántulas.

Las muestras obtenidas del semillero, un total de 100 plántulas, fueron retiradas de la bandeja de alveolos junto con su cepellón, y extendidas sobre papel de filtro siendo estas numeradas para su posterior identificación tal y como se observan en las siguientes figuras.





FIGURA 10: Selección de las plántulas muestreadas.

Ya identificadas las plántulas se procede a la previa separación de la parte aérea de dicha plántula de su cepellón, con la ayuda de un bisturí y mediante un corte realizado en el cuello de la planta. A continuación se lava el material vegetal con agua directamente del grifo para eliminar los restos de sustrato procedente del cepellón y fertilizantes que puede contener sus hojas, y se procede anotación de datos, se tomará como dato cada uno de los daños y/o fisiopatías que presentan éstas, así como en la zona donde se localiza.



FIGURAS 11: Estudio y anotación de los daños en las plántulas.

3.1.1.3. Análisis de los daños.

Una vez anotados los daños presentes en el material vegetal, se llevó a cabo el análisis de los mismos, este método consistió en aislamientos de las zonas dañadas de la planta, así como la comparación de otros aislamientos con una planta sana. Todo ello se realizó en condiciones de esterilidad.

El método operativo fue el siguiente:

Antes de comenzar con el análisis se limpió la zona de trabajo con alcohol, a modo de desinfección, una vez limpia la zona se colocó el material necesario para llevar a cabo este proceso. Un mechero de alcohol, un frasco de alcohol, placas Petri, tijeras, bisturí, pinzas,...

Con ayuda de las pinzas y tijeras previamente desinfectadas, se efectuó la separación de las partes de interés de las plántulas, estas partes corresponden a aquellas zonas de la plántula donde se localizó los daños; tallo, cotiledones, hojas verdaderas, así

como un estudio de raíz. Los trozos cortados fueron depositados en una placa Petri en medio agar-patata-dextrosa (PDA), estas placas fueron anotadas con el número de la plántula de melón variedad Ricura, junto con la zona de donde proviene la muestra de interés. Este proceso se llevó a cabo en cada una de las muestras, desinfectando el material para cada corte, a pesar de localizarse en la misma plántula.

Al finalizar con este proceso, las placas Petri fueron selladas con Parafilm® e introducidas en la estufa durante 24 horas, para la posterior observación de los resultados.

Transcurridas 48 horas de la colocación de las placas en la estufa se procede a su estudio siendo tiempo suficiente para ver el crecimiento que se produjo de los aislamientos de las plántulas de melón, los resultados fueron anotados.

3.1.2. Análisis de semillas.

Al igual que las plántulas de melón, El Plantel Semilleros, nos cedió 100 semillas de la misma variedad correspondiente a las plántulas de estudio, variedad Ricura.

El método de análisis de estas fue el siguiente:

Se tomaron 10 placas Petri con medio agarizado (PDA), y se produjo a la división de las mismas en cuadrícula, en cada una de las divisiones se dispuso la colocación de una semilla de melón variedad Ricura, tal y como se muestra en las imágenes.

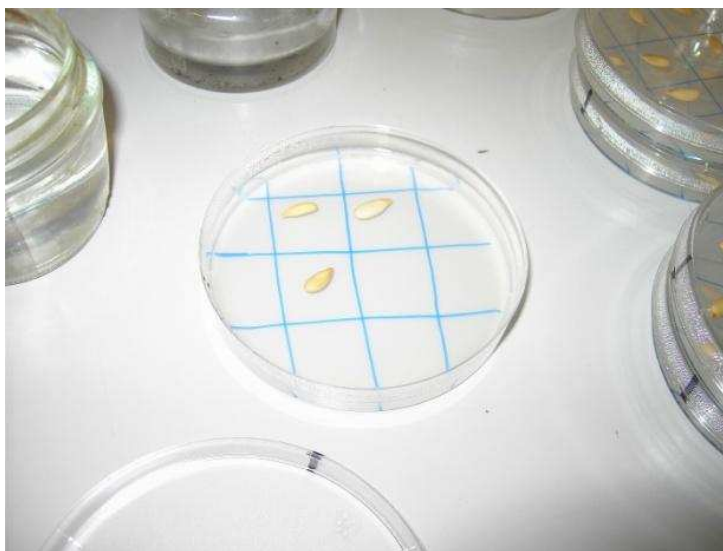


FIGURA 12: Distribución de semillas en placas.

Repitiendo el mismo proceso que para las plántulas, las placas fueron selladas con Parafilm® e introducidas en la estufa durante varios días.

Pasados 48 horas a temperatura ambiente, mostraron el siguiente aspecto, semillas pregerminadas y la aparición de colonias de hongos así como bacterias.



FIGURA 13: Semillas de melón Ricura, pasadas 48 horas a temperatura ambiente.

4. IDENTIFICACIÓN DE RESULTADOS EN PLACA.

De los aislamientos que se presentaron en el medio PDA y anteriormente mostrados, se replicaron los resultados más relevantes, evitando así contaminación. Para identificar los microorganismos presentes se realizaron los siguientes métodos.

4.1. Identificación de hongos.

Con el fin de alcanzar este objetivo, la identificación de hongos fue a través de visualización directa a través de microscopio y fueron identificados a partir de su morfología.

4.2. Identificación de bacterias.

La técnica utilizada fue la PCR basas en técnicas de biología molecular centrada en el análisis de bacterias.

Esta técnica fue llevada a cabo con la siguiente serie de pasos:

- Extracción de DNA mediante Kits comerciales.
- PCR mediante la utilización de cebadores universales que codifican para ADNr 16S (Cenis *et al.*1996)

Al finalizar este proceso se llevo a los servicios técnicos de la Universidad de Almería donde se realizó la secuenciación pertinente.

- Extracción de DNA mediante Kits comerciales.

5. EXTRACCIÓN DEL ADN SIGUIENDO EL PROTOCOLO E .Z. N. A.

El protocolo (E Z N A plant ADN kit, Omega Bio-tek) distingue diferentes métodos dentro del mismo para llevar a cabo la correcta extracción, vamos a utilizar el protocolo corto que es un método simplificado que permite la rápida visualización del ADN desde especímenes frescos, congelados o secos para el uso en reacciones PCR. El procedimiento limita la cantidad de material que se utiliza al principio, así que los resultados obtenidos con éste protocolo serán de menor calidad que los obtenidos en el protocolo A y B.

Materiales y métodos:

- Centrifugadora
- Tubos para la centrifugadora de libre enucleación
- TE precalentado a 65°
- Agua estéril
- 2- mercaptoetanol
- Etanol a 96-100%
- Isopropanol
- ARNasa de concentración 20 mg/ ml

Si partimos de tubos de microcentrífuga con colonias crecidas en medios de cultivo líquido, centrifugar 1 ó 2 minutos a 10.000 revoluciones hasta obtener el pellet.

Posteriormente eliminar el sobrenadante y quedarnos sólo con el pellet.

1. En un tubo de microcentrífuga que contiene el pellet, añadir 600µl de Buffer P1 y 40µl de Rasa. (20 mg/ml). Mezclar en el vortex e incubar a temperatura ambiente 1 minuto. Añadir 10µl de 2- mercaptoetanol y mezclar en el vortex.
2. Incubar a 65° C 5 minutos, durante la incubación realizar una mezcla mediante inversión de los tubos de micro centrífuga a la mitad del periodo de incubación.
3. Añadir 140µl de Buffer P2 y mezclar en el vortex. Centrifugar a 10.000 revoluciones durante 10 minutos.
4. Aspirar cuidadosamente 600µl del sobrenadante y colocarlo en un tubo de microcentrífuga nuevo, intentando no mezclar o aspirar el pellet o llevar algún resto.

Añadir medio volumen de Buffer P3, es decir, 300µl, y un volumen de etanol absoluto.

Mezclar hasta tener una mezcla homogénea.

Nota: puede producirse el precipitado pero no afectará el proceso.

5. Llevar 800µl de la mezcla a la columna de extracción del ADN. Ésta columna está ensamblada en un tubo de 2ml.

Centrifugar a 10.000 revoluciones durante 1 minuto para que quede sobre la columna el ADN.

Desechar el líquido que pasa a través de la columna y el tubo de microcentrífuga en el siguiente paso.

6. Añadir el resto de la muestra incluido el precipitado que se haya podido formar a la columna. Centrifugar a 10.000 revoluciones durante 1 minuto y desechar tanto el tubo de microcentrífuga como el líquido que haya pasado a través del filtro.
7. Poner la columna en un segundo tubo y añadir 750µl de Buffer de lavado diluido con etanol absoluto. Centrifugar a 10.000 revoluciones durante 1 minuto y desechar el líquido que pase a través de la columna. Mantener el tubo de 2ml.
8. Repetir el paso 7 del lavado con otros 750µl de Buffer de lavado, y centrifugar a 10.000 revoluciones durante 1 minuto. Desechar el líquido que pasa por el filtro y rehusar el tubo del paso 9.
9. Centrifugar la columna vacía durante 2 minutos al máximo de velocidad para secar, éste paso es crítico para eliminar el etanol residual que pudiera quedar en el ADN e interferir.
10. Llevarla columna a un microtubo de 1,5ml. Añadir 100µl de TE precalentado a 65° C e incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 10.000 revoluciones 1 minuto.
11. Repetir el paso 10 con otros 100µl de Buffer.

5.1. Los iniciadores.

En estudios anteriores se realizó el diseño de los iniciadores. Para ello, se ha accedió a la página web (www.ncbi.nlm.nih.gov) donde aparecen secuencias ya clonadas de forma parcial o total del genoma *E. persicina*. Se seleccionaron en primer lugar secuencias de esta especie que hubieran sido empleadas para taxonomía de enterobacterias, en concreto se seleccionó la secuencia con número de ascensión AB272 647, que se corresponde con un fragmento de 719 pares de bases (pb) que codifica a heat shock protein 40 (DNAj). Estos cebadores fueron nombrados como pEW1 y pEW2 (Miñano, 2008). La secuencia de ambos cebadores es la siguiente:

pEW1: 5`GCTGTCGCTGGAAGAAGCGGTACGCGGCGT

pEW2: 5`- CGTAGCAGCGATTTCTGCTTCTCATTTCAGG- 3`

Con estos cebadores, el tamaño esperado de banda es de 660 pb.

Además, se utilizaron como control los cebadores universales que amplifican una región de 1000 pb del gen 16S RNAr; estos son:

616V: 5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'

699R: 5' - RGG GTT GCG CTC GTT -3'

Obtenidos de Invitrogen (Life Technologies).

5.2. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR.

La PCR es una técnica “in vitro”, que imita la habilidad natural de las células de ADN. Se trata de una técnica usada para replicar el ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5' > 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la Reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas: desnaturalización, apareamiento con cebadores y extensión por una ADN polimerasa termorresistente, por lo que es un método muy simple para la ampliación de ácidos nucleicos (Saiki y col., 1985; Mullis y Faloona, 1987). Como se ha dicho su fundamento es el proceso natural de la replicación del ADN, y tras cada paso, el número de células de ADN formadas es el doble de las presentes en el paso anterior. Partiendo de una molécula de “ADN diana” podremos amplificar una secuencia específica contenida en ella, mediante la utilización de unos oligonucleótidos o cebadores diseñados para éste fin.

Hasta 1980 el único método para obtener grandes cantidades de un fragmento de ADN era clonándose en vectores y multiplicándolo en bacterias.

En 1985, un investigador norteamericano, Kary Mullis, desarrollo un método que permite a partir de una pequeña muestra de ADN, obtener millones de copias de células de ADN in vitro. Esta técnica requiere conocer la secuencia de nucleótidos de los extremos del fragmento que se quiere amplificar.

La mezcla de reacción contiene:

- ✓ La secuencia de ADN que se quiere amplificar.
- ✓ Dos oligonucleótidos sintéticos que sirven de cebadores.
- ✓ Los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (ATP, GTP, CTP, TTP)

El proceso es el siguiente:

La mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización, hibridación o alineación y elongación.

- El proceso de desnaturalización: Las dos cadenas de ADN utilizadas como diana son separadas mediante la incubación a una temperatura elevada (92°-96°) dependiendo de su contenido en G+C. Las hebras disociadas permanecerán en esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la hibridación de los cebadores.

- Durante el proceso de hibridación: Los cebadores utilizados son un par de oligonucleótidos sintéticos capaces de unirse a secuencias de ADN que limitan físicamente con la región que se pretende amplificar. Cada uno de ellos es una réplica de una de las cadenas del ADN y su diseño es tal que quedan enfrentados por sus extremos 3' tras la unión a la molécula de "ADN diana". La distancia entre ellos en el conjunto ADN-cebadores determinará la longitud de la secuencia de ADN amplificada.

- Durante el proceso de elongación: El tercer paso consiste en la elongación de los cebadores por la acción de la ADN polimerasa. Las condiciones en las cuales se desarrolla depende directamente del tipo de ADN polimerasa utilizado. El resultado del proceso es la formación de unas cadenas de ADN copiadas de las moléculas diana y que han incorporado en el extremo 5' de su secuencia la del respectivo cebador. En la elongación de los cebadores interviene una ADN polimerasa purificada a partir de un microorganismo termófilo, *Thermus aquaticus*. (Saiki y col 1988).

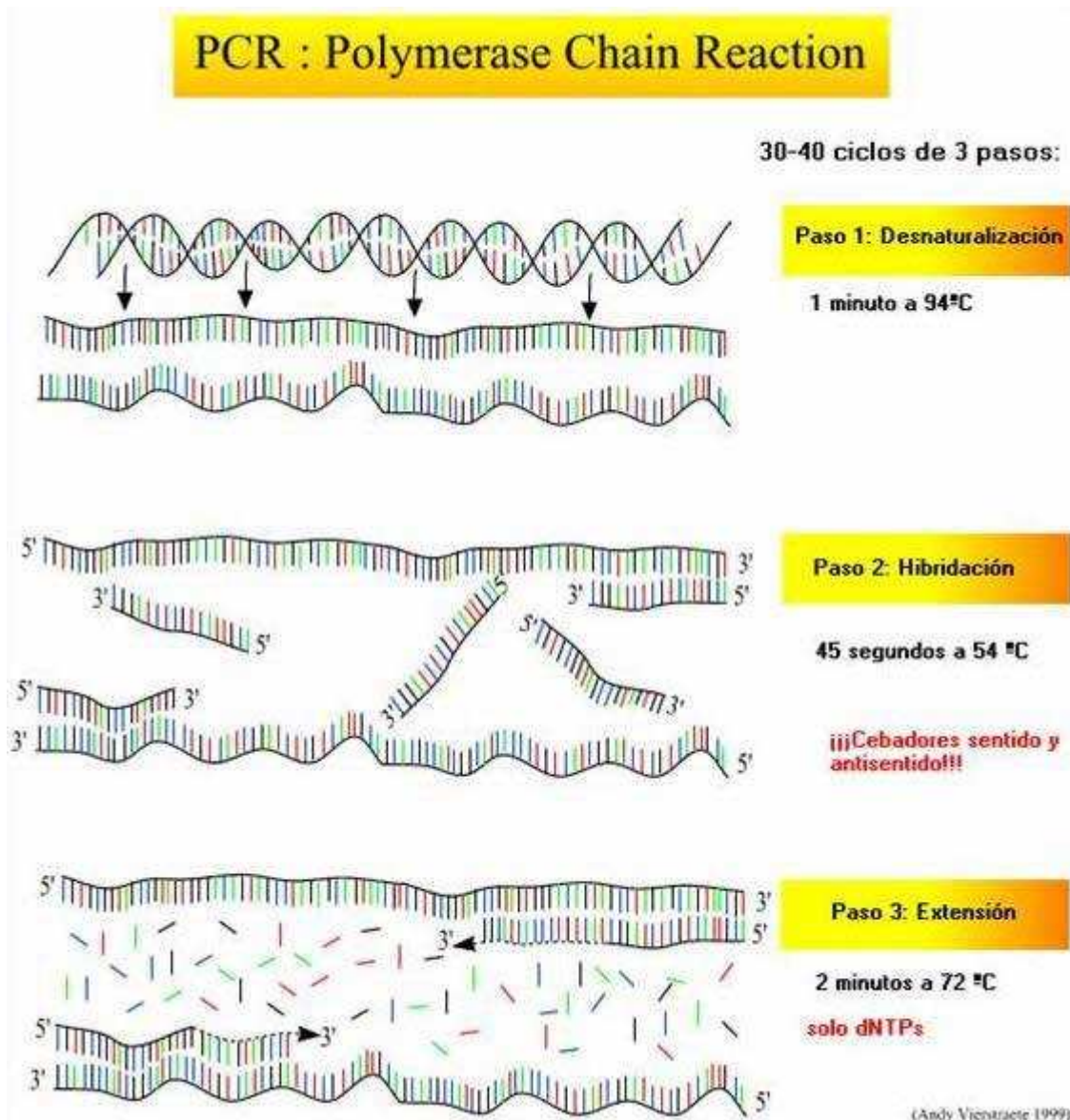


FIGURA 14: Pasos básicos de la PCR (de Andy Vierstraete 1999)

En la técnica de reacción en cadena de la ADN polimerasa cada conjunto de estos tres pasos (desnaturalización, hibridación y elongación) constituye un ciclo. A partir del tercer ciclo se empieza a acumular el producto de interés, delimitado por los extremos 5' de los cebadores. A medida que aumenta el número de ciclos, este producto pasa a ser la molécula diana a la cual se unirán preferentemente las moléculas de cebador presente en la mezcla, conduciendo a una acumulación teóricamente exponencial del producto.

En la mezcla también se obtienen otros “productos largos”, una de cuyas cadenas deriva de las moléculas originales diana.

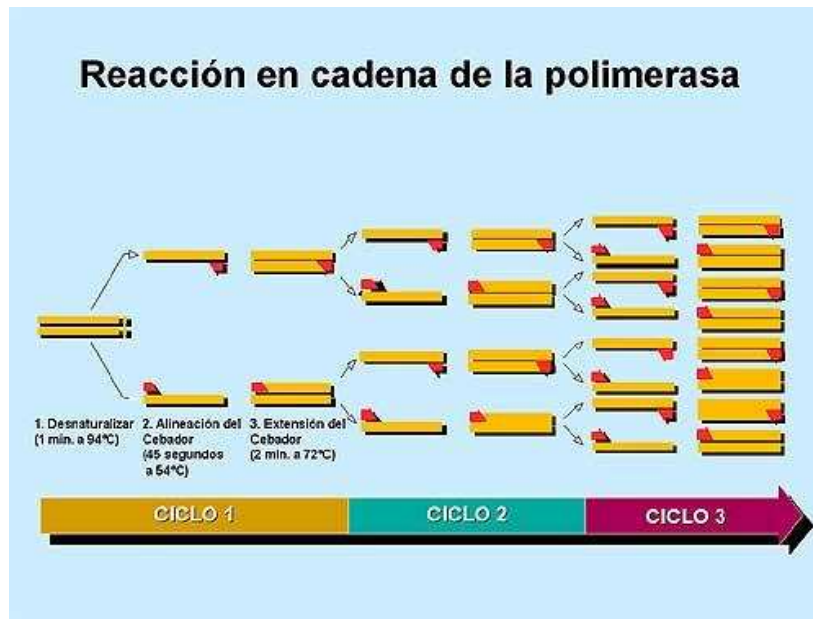


FIGURA 15: Amplificación exponencial del PCR

La detección del producto obtenido en la PCR se utiliza mediante electroforesis en gel de agarosa, siguiendo el método descrito por Sambrook y col, (1989). Se utilizó agarosa dependiendo del tamaño de la ampliación y la resolución que deseemos utilizaremos diferentes medios a diferentes concentraciones, como se muestra en el siguiente apartado.

La posterior visualización se realizó tiñéndolo con una solución de bromuro de etidio en agua destilada. El bromuro de etidio es un agente intercalante que se une a la doble hélice de ADN y produce una luz anaranjada cuando el gel se ilumina con ultravioleta.

Actualmente la polimerasa que se utiliza para la PCR es la Taq polimerasa, porque ha simplificado enormemente la técnica, ya que ha permitido su automatización.

El protocolo que nosotros hemos seguido para la realización de la PCR es el siguiente:

1) En una base de hielo picado se colocó una gradilla para tubos de PCR de 0,25 ml. Tras su etiquetado se añade a cada uno de ellos 5 µl de ADN, muestras que previamente se han obtenido llevando a cabo el protocolo corto E. Z. N. A. y que fueron conservados en el congelador.

2) La composición de la reacción (Premix) se indica a continuación en la tabla 2. Lógicamente, se utilizan los cebadores correspondientes para cada reacción (Serie 1: cebadores universales; Serie 2: cebadores diseñados correspondientes a la zona DNAj, especificados en el apartado de resultados y discusión.

SERIE 1	SERIE 2
5µl de tampón	5µl de tampón
2,5µl de oligo 1,pA	2,5µl de oligo 2,EW1
2,5µl de oligo 1,pH	2,5µl de oligo 1,EW2
0,25µl taq-polimerasa	0,25µl taq-polimerasa
1µl DNTs	1µl DNTs
2µl Mg	2µl Mg
31,75µl de agua pura	31,75µl de agua pura

CUADRO 5: Reactivos para la reacción de PCR

3. La aplicación de la Taq polimerasa al premix se realiza al final para evitar el comienzo de la actividad de la misma.

4. Finalmente se añaden 45 µl de premix a cada tubo obteniendo un volumen final de 50 µl. Se colocan los tubos en el termociclador con las condiciones de PCR ya programadas.

Las mezclas de las reacciones (premix) se multiplican según el número de reacciones a realizar, preparando 1 ó 2 reacciones de más por fallos en el pipeteo.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Paso 0) 94° C durante 4 minutos

Paso 1) 94° C durante 1 minuto

Paso 2) 72° C durante 2 minutos.

Paso 3) volver al paso 2^a, 34 veces.

Paso 4) 72° C durante 10 minutos.

Paso 5) 10° C infinito.

Para la optimización de las condiciones, se realizaron cambios en los tiempos del paso 2 y en el número de ciclos.



FIGURA 16: Termociclador usado en el presente PFC.



FIGURA 17: Termociclador donde podemos observar las diferentes partes para su programación y posterior funcionamiento.

5.3. Electroforesis de los productos de la PCR.

La electroforesis en general permite la separación de moléculas como consecuencia de su diferente movilidad en un campo eléctrico. Por lo tanto el parámetro esencial es la diferente carga eléctrica de las moléculas. La carga depende del pH del medio, en el gel de agarosa, que es el medio que tenemos se observa un gran avance de las moléculas, por lo que la movilidad dependerá mucho del tamaño de las moléculas.

La agarosa es un polisacárido, cuyas disoluciones poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de los 50° C y formar un gel, semisólido, al enfriarse. Éste gel está formado por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas, embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas de ácido nucleico a su través, en mayor medida cuanto más grandes sean éstas.

Dado que la fuerza impulsora es proporcional a la carga eléctrica, el parámetro que rige el avance es la relación carga/masa. Para un ácido nucleico la carga eléctrica es proporcional a la longitud de nucleótidos, por lo que la relación q/m es la misma para todas sus moléculas. Sin embargo el efecto del retardo debido al gel depende del tamaño molecular. Como resultado neto la electroforesis separa los fragmentos de ácido nucleico según su tamaño o longitud, expresado en nucleótidos, si son de hebra sencilla, o en pares de bases si son de doble hebra, caso del ADN. Por ello se puede establecer una curva de calibrado que relacione la movilidad con la longitud en pares de bases (pb).

Concentración de agarosa	Tamaño de los fragmento de ADN separados
0,3 %	5-60 KB
0,5 %	1-30 KB
0,7 %	0,8-12 KB
1,0 %	0,5- 10 KB
1,2 %	0,4- 7 KB
1,5 %	0,2-3 KB
2,0 %	0,05-2 KB

CUADRO 6: Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de los distintos tamaños de fragmentos de ADN.

Una vez acabada la técnica de la PCR, se conservan los productos en tubos de microcentrífuga en el frigorífico, y se prepara el gel de agarosa, para el cual se ponen 100ml de TBE 10x y lo diluiremos con agua destilada hasta completar 1 l de ésta disolución, posteriormente en un vaso de precipitado se homogeniza 100ml de ésta solución con 0,80g de agarosa, (aunque tendremos en cuenta que la concentración de agarosa va depender de los pares de bases que tengamos) y calentamos en el microondas hasta que la mezcla quede translúcida.

Se limpian bien las placas de metacrilato se sellan los bordes y ponemos el gel de agarosa, le colocamos el peine para hacer los pocillos en los cuales suspenderemos las muestras.

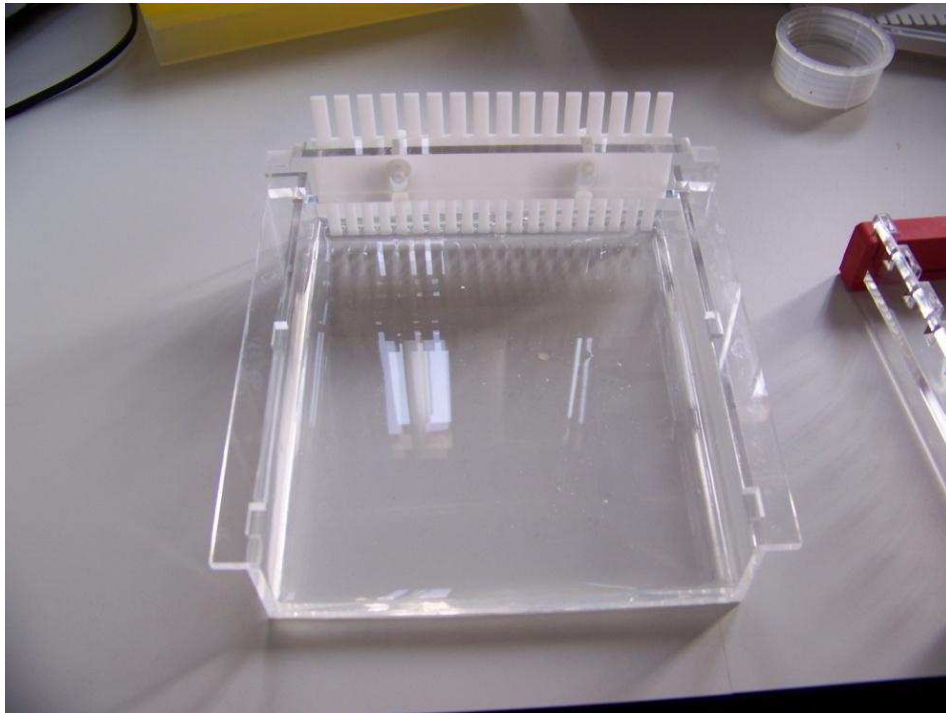


FIGURA 18: Placas de metacrilato, con el peine para hacer los pocillos.



FIGURA 19: Gel de agarosa líquido, al disminuir la temperatura solidificará.

En cada pocillo depositaremos una solución que contiene 10 μ l de su muestra correspondiente, más 3 μ l de colorante, mezclada previamente.



FIGURA 20. Carga del gel de agarosa, y detalle de la carga.

Una vez cargado el gel se corren los productos, para ello, se conecta a una fuente de alimentación aproximadamente a 50mA, (aunque la intensidad dependerá de la concentración del gel de agarosa empleada) durante 30 min.

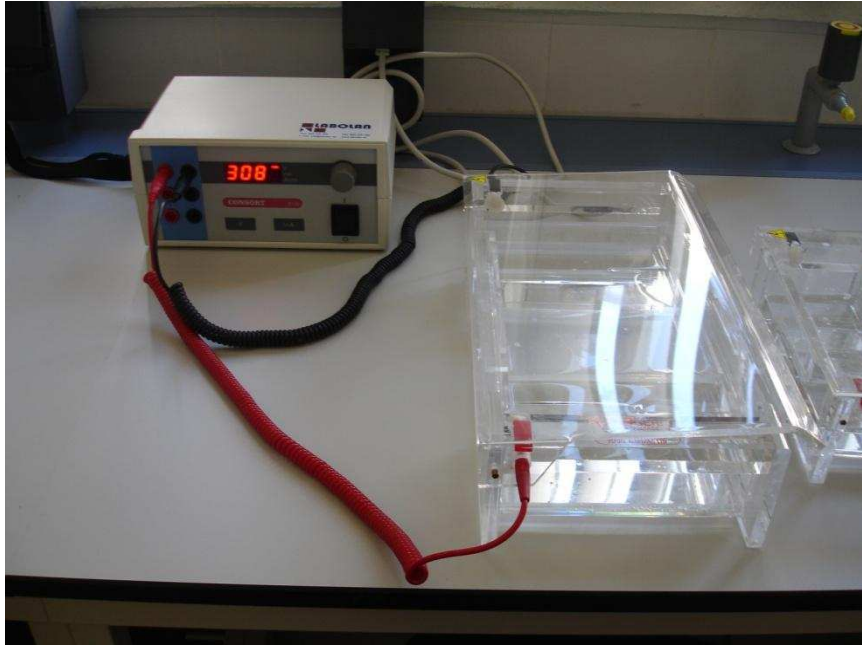


FIGURA 21. Fuente de alimentación conectada al gel.

Finalmente se suspende el gel en una solución de bromuro de etidio, lo dejamos que se tiña y se observa con lámpara ultravioleta, como se indicó anteriormente.

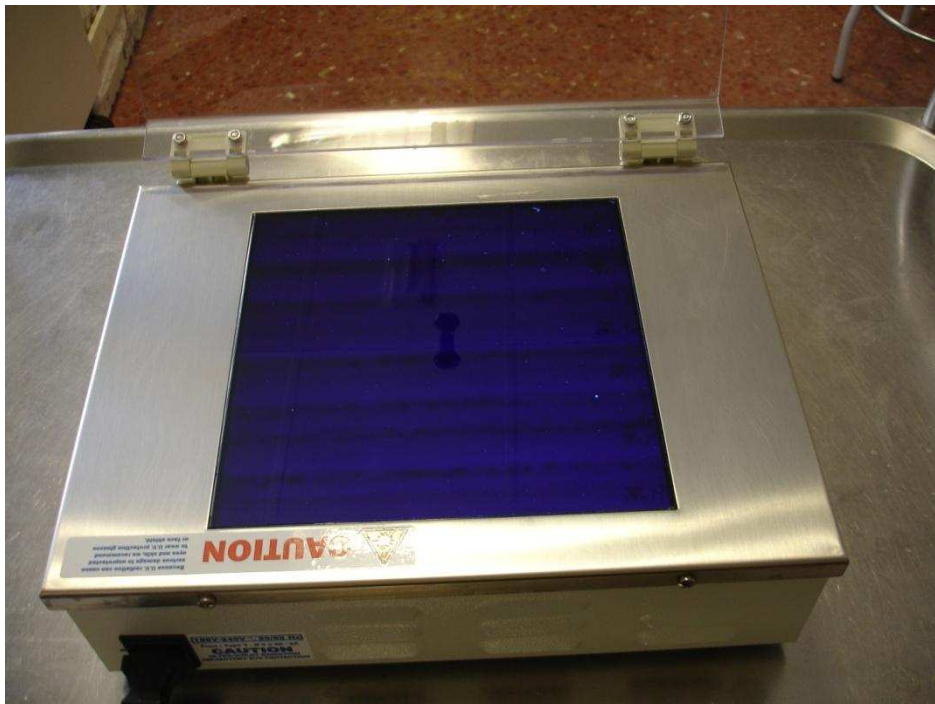


FIGURA 22. Lámpara de luz ultravioleta para la visualización de gels.

El gel teñido se fotografió para su posterior análisis.

6. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR.

El kit de purificación de fragmento de PCR empleado es Jet quick Spin Column Tecnie, (Genomed GMBH). El protocolo es el siguiente:

1. Mezclamos todas las muestras de ADN que sean iguales, es decir que provengan del mismo aislado.
2. Le añadimos 400µl de H1, procedente del kits, y lo volteo.
3. Lo paso a las columnas y centrifugo durante 1 minuto a 12.000 revoluciones.
4. Elimino el sobrenadante que me queda en el tubo, y se añaden 500µl de H2, centrifugo durante 1 minuto a 12.000 revoluciones, y de nuevo se desecha el sobrenadante.
5. Se centrifuga de nuevo con la columna vacía, con el objetivo de secar.
6. Se ponen las columnas sobre tubos de microcentrífuga limpios, y se le añade 50µl de agua destilada estéril, previamente calentada a unos 65° C, y se vuelve a centrifugar durante 1 minuto a 12.000 revoluciones.
7. Se eliminan las columnas, y ya he obtenido el ADN purificado, el cual conservaré en lo tubos de microcentrífuga, para posteriormente enviarlos a secuenciar.

7. MEDIOS DE CULTIVO.

En este trabajo se han utilizado diferentes medios de cultivo, con el fin de constituir un medio adecuado para el desarrollo de los hongos.

Los medios utilizados se prepararon en una botella de vidrio para autoclave, a la cual se le adicionaron los componentes de cada medio.

Una vez que se cerró la botella y se agitó para homogenizar su contenido, se introdujo en un autoclave con una potencia de 3500 W, donde permaneció a 121 °C durante 20 minutos.

Una vez que se esterilizó el medio, se dejó enfriar hasta que alcanzó una temperatura próxima a 50°C, en este momento se comenzó el vertido de 15 ml de éste por placa Petri de 9 cm de diámetro mediante dos formas, gracias a un dosificador previamente esterilizado, o manualmente. Ambos procesos se realizaron en un medio aséptico evitando así posibles contaminaciones.

7.1. Medio Caldo Nutritivo (CN).

Este medio es un preparado comercial y se ha utilizado para hacer crecer a las bacterias resultantes en el primer ensayo, localizadas en un medio de cultivo PDA.

Su composición es:

- Caldo Nutritivo (CN).....8g
- Agua destilada1000ml

En la balanza y sobre una hoja se pesan los 8 g de preparado comercial del Caldo Nutritivo, se adicionan al frasco de vidrio especial para autoclave y se le añaden 1000ml de agua destilada hasta su enrase.

7.2. Medio agar-patata-dextrosa (PDA)

Se ha sido utilizado para el análisis de las plántulas en el laboratorio, ya que sobre este medio se desarrollan muy bien los géneros fúngicos y las bacterias.

Su composición es:

- Agar15g
- Patata.....200g
- Glucosa/Dextrosa.....20g
- Agua destilada.....1000ml

Se hierven los 200g de patata en 800ml de agua destilada durante 1 hora, después se filtra a través de muselina. Al filtrarlo se le añade el agar y la dextrosa y se enrasa hasta 1000ml. Se esteriliza en el autoclave durante 20 min. A 121 °C

7.3. Medio de cultivo Triptona- Sacarosa- Agar.(TSA)

Es un preparado comercial compuesto por Triptona, Sacarosa y Agar. Utilizado al igual que el medio de cultivo PDA para el análisis de las plántulas en el laboratorio, desarrollándose en él correctamente los géneros fúngicos y las bacterias.

8. ANÁLISIS MOLECULAR.

Los componentes necesarios para llevar a cabo el análisis molecular son los siguientes:

8.1. Ordenación del ADN de las muestras estudiadas.

Una vez obtenido la secuenciación de las muestras, los datos son llevados al programa Chromas Pro 1.5. cuya función es completar las cadenas de ADN de posibles errores y poderlas exportar posteriormente a la plataforma NCBI, la cual nos proporcionará los posibles resultados, dependiendo del tipo de muestra que se utilice en ese momento.

II. RESULTADOS Y DISCUSIONES:

1. IDENTIFICACIÓN DE RESULTADOS.

1.1. Método de análisis para los resultados obtenidos en el análisis de las plántulas.

Como se puede observar en las siguientes figuras, las placas al trascurrir 48 horas en el a temperatura ambiente presentaron el siguiente aspecto,

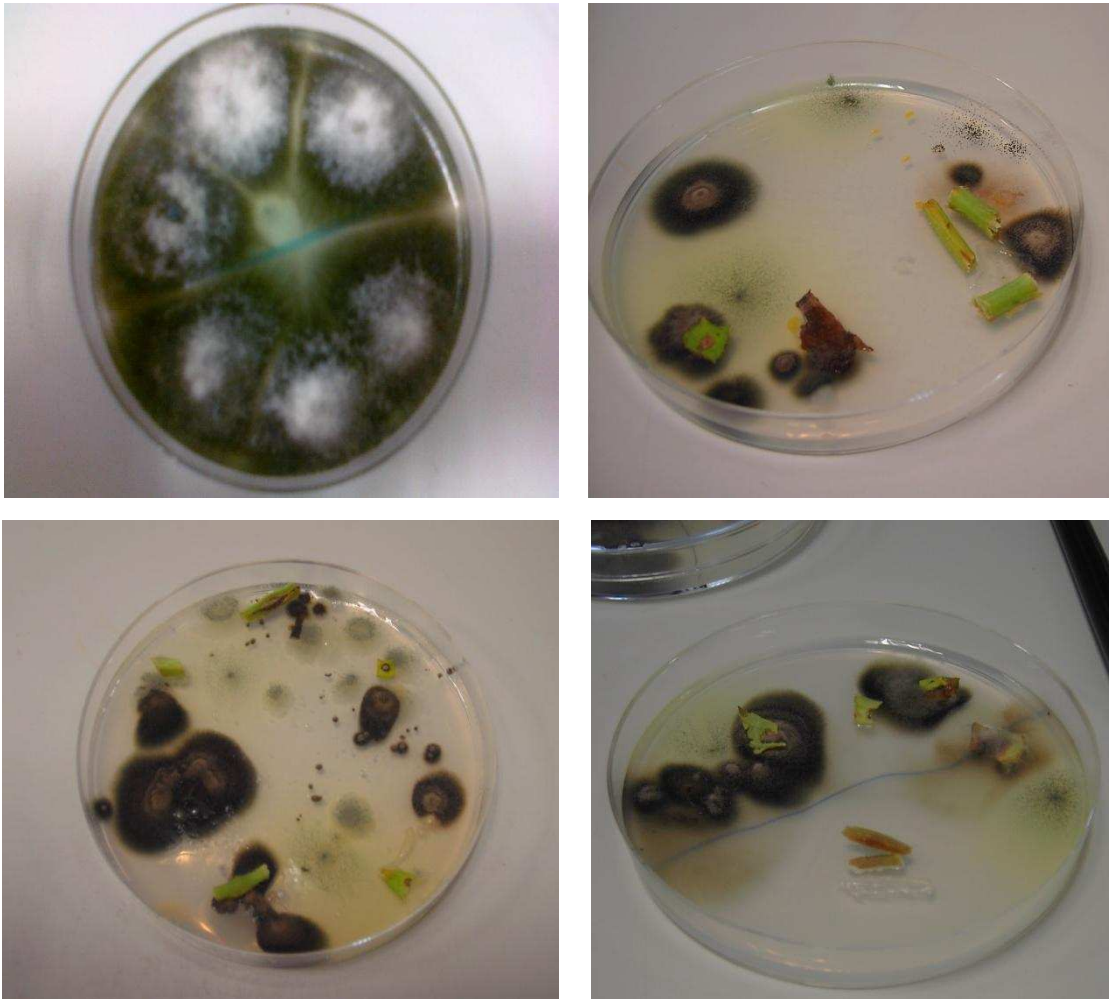


Figura 23: Resultado de las placas con las muestras de plántulas, pasado 48 horas en estufa.

1.2. Resultados obtenidos en placas.

Los cuadros que se muestran a continuación corresponden a la recogida de datos, según los resultados obtenidos en las placas de muestreo, donde se llevo a cabo el análisis, tanto de las plántulas de melón, variedad Ricura, como de las semillas correspondientes a la misma variedad.

1.2.1. Resultados del análisis de plántulas.

NOMBRE DE LA PLANTA (Código placa).	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
PLANTA M30	P1	Cotiledones: de color amarillo. Hojas: manchas necróticas Tallo: no presenta lesiones	Hojas: - <i>Cladosporium</i> . - Bacteria. Tallo: - Bacteria. - hongo: <i>Aspergillus</i> .
PLANTA M29	P2	Hojas: Lesiones necróticas. Tallo: rajado en la zona del cotiledón y en el 1er nudo (2 lesiones)	Hojas: - <i>Cladosporium</i> . Tallo: - <i>Cladosporium</i> .
PLANTA M31	P3	Cotiledones: amarillos	Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
PLANTA M32	P4	Tallos: pudrición en el cuello desde la base hasta el cotiledón. (vasos limpios) Cotiledones: amarillos	Tallo: - <i>Trichoderma sp.</i> Hojas: - Bacteria.
PLANTA M33	P5	Tallos: cuello podrido Cotiledones: amarillos	Tallo: - Presencia de <i>Pythium aphanidermatum</i> .
PLANTA M34	P6	Cotiledones: manchas aceitosas	Cotiledones: - Bacteria
PLANTA M35	P7	Cotiledones: amarillos Tallo: lesión en el 1er nudo. Hojas: lesión necrótica	Tallo: - Bacteria Hojas: - Bacteria

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (nº)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
PLANTA M36	P8	<p><u>Cotiledones</u>: amarillo <u>Tallo</u>: rajado entre el cotiledón y el 1er nudo. Vaso central necrosado <u>Hojas</u>: manchas necróticas.</p>	<p>Tallo: - bacteria Hojas: - hongo.</p>
PLANTA M37	P9	<p><u>Cotiledones</u>: amarillo. <u>Tallo</u>: rajado en el 3er nudo. <u>Hojas</u>: mancha necrótica</p>	<p>Tallos: - <i>Pythium aphanidermatum</i>. - Flameado: Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i>.</p>
PLANTA M38	P10	<p><u>Cotiledones</u>: amarillo. <u>Tallo</u>: podrido desde la raíz hasta el cotiledón.</p>	<p>Phoma cucurbitacearum (<i>Didymella Bryoniae</i>)</p>
PLANTA M39	P11	<p><u>Cotiledones</u>: Amarillo <u>Tallo</u>: rajado hasta el cotiledón. <u>Hojas</u>: manchas necróticas.</p>	<p>Tallo: - Flameado: Bacteria. T. - sin flamear: <i>Cladosporium</i>. Hojas: - Cladosp.</p>
PLANTA M40	P12	<p><u>Tallo</u>: lesión necrótica 1er nudo.</p>	<p>Tallo: - <i>Cladosporium</i>.</p>
PLANTA M41	P13	<p><u>Tallo</u>: rajado, lesión necrótica desde cotiledón hasta 1er nudo. <u>Hojas</u>: lesiones muy marcadas.</p>	<p>Tallo: - <i>Cladosporium</i>.</p>
PLANTA M42	P14	<p>Planta muerta con tallo podrido, no tiene hoja</p>	<p>Phoma cucurbitacearum (<i>Didymella Bryoniae</i>)</p>

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (nº)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
Amalia planta 2	P16	<u>Tallos</u> :rajados <u>Hojas</u> : con puntos necróticos	Tallos: - Rajado: hongo. - Rajado (flameado): Bacteria. - cerca de la base: Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Amalia planta 1	P15	<u>Hojas</u> : con manchas aceitosas y punto necróticos.	Hojas: - <i>Cladosporium</i>
Amalia Planta 3	P17	<u>Tallo</u> : rajado en la altura de los cotiledones. <u>Hojas</u> : borde quemado y contorno amarillo, pedúnculos rajados, y puntos necróticos.	Tallos: - Rajado (flameado): bacteria. Hojas: - Flameado: Bacteria. - Puntos necróticos: hongo y bacteria.
Amalia Planta 4	P18	<u>Tallo</u> : Daños en el cuello de la planta. <u>Hojas</u> : Puntos necróticos	Tallos: - Herida en cuello: hongo y bacteria. - Herida flameada: bacteria. Hojas: - Puntos necróticos: <i>Cladosporium</i> . Raíz: Bacteria.
Amalia planta 5	P19	<u>Tallo</u> : heridas en peciolo. <u>Hojas</u> : puntos necróticos.	Tallos: - Herida tallo altura cotiledones: Hongo - Herida peciolo flameado: Hongo y Bacteria.

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (nº)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
Amalia planta 6	P20	<p><u>Tallo</u>: daño en el cuello bajo cotiledones, mancha marrón y herida.</p> <p><u>Hojas</u>: mancha aceitosa.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Herida: Bacteria. - Pedúnculo <i>Cladosporium</i> <p>Hoja:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mancha aceitosa: Bacteria. - Mancha aceitosa (flameada): Bacteria.
Amalia planta 7	P21	<p><u>Tallo</u>: daño en el cuello altura cotiledones, mancha marrón y herida.</p> <p><u>Hojas</u>: puntos necróticos.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Daño cuello: <i>Cladosporium</i> y Bacteria. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Punto necróticos: hongo <p>Raíz: Bacteria</p>
Amalia planta 8	P22	<p><u>Hojas</u>: puntos necróticos.</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i> - Bacteria.
Amalia planta 9	P23	<p><u>Hojas</u>: puntos necróticos</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria (sin flamear) - Hongo. <p>Tallo: Bacteria.</p>
Amalia planta 10	P24	<p><u>Hojas</u>: puntos necróticos</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i> - Bacteria. <p>Tallo(sin flamear):</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria.
Isa planta 1	P25	<p><u>Tallos</u>: Rajado.</p> <p><u>Hojas</u>: necróticas.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>. <p>Hoja:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
Isa Planta 2	P26	<p><u>Hojas</u>: Necrótica</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
Isa Planta 3	P27	<p><u>Tallo</u> totalmente marrón.</p> <p><u>Hojas</u>: necróticas.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (nº)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
Isa Planta 4	P28	Análisis de sustrato	Sustrato: - Nematodos.
Isa planta 5	P29	<u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: <i>Cladosporium</i> .
Isa Planta 6	P30	<u>Tallo</u> : rajado. <u>Hojas</u> : necróticas	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 7	P31	<u>Tallos</u> necrosado. <u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hoja: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 8	P32	<u>Tallo</u> : necrosado. <u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo(flameado):: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 9	P33	<u>Tallos</u> : mancha negra. <u>Hojas</u> : negras más de la mitad.	Tallo flameado. Hojas: - Hongo. - Bacteria.
Isa planta 10	P34	<u>Tallo</u> : necrosado. <u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 11	P35	<u>Tallo</u> : cuello podrido. <u>Hoja</u> : necrótica.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 12	P36	<u>Tallo</u> : Rajado. <u>Hojas</u> necróticas	Tallo: - Bacteria. Hoja: - Bacteria.
Isa planta 13	P37	<u>Tallo</u> : podrido. <u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Isa planta 14	P38	<u>Tallos</u> : podridos. <u>Hojas</u> : necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (nº)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
Al #1	P39	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Al #2	P40	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Al #3	P41	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria.
Al #4	P42	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
Al #5	P43	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hoja: - <i>Cladosporium</i> .
Al #6	P44	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas	Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria.
Al #7	P45	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hoja:</u> necrótica.	Tallo: - Bacteria.
Al #8	P46	<u>Tallo:</u> rajado. <u>Hojas:</u> necróticas	Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria.
Al #9	P47	<u>Tallo:</u> Daños en el cuello de la planta. <u>Hojas:</u> negras más de la mitad.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria.
P1	P48	<u>Hojas:</u> Manchas aceitosas y necróticas. <u>Cotiledones:</u> Decoloración	Hojas: - Hongo.
P2	P49	<u>Tallo:</u> rajado del tallo(3 ^{er} entrenudo). <u>Hojas:</u> borde quemado, puntos necróticos.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hojas: - <i>Cladosporium</i> .

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (nº)	SINTOMATOLOGÍA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
P3	P50	<p><u>Tallo:</u> estrechamiento y pudrición en la base del tallo.</p> <p><u>Hojas:</u> manchas aceitosas en la base.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Pythium aphanidermatum</i>. <p>Cotiledón:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Pythium aphanidermatum</i>.
P4	P51	<p><u>Tallo:</u> Estrechamiento en la base.</p> <p><u>Cotiledones:</u> manchas aceitosas, marchitados.</p> <p><u>Hojas:</u> manchas cloróticas.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
P5	P52	<p><u>Tallo:</u> estrechamiento en la base.</p> <p><u>Hojas:</u> mancha aceitosas.</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
P6	P53	<p><u>Tallo:</u> Rajado en el 2º y 3º entrenudo (2 lesiones)</p> <p><u>Hojas:</u> puntos necróticos.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i> <p>Hoja:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
P7	P54	<p><u>Tallo:</u> estrechamiento en su base.</p> <p><u>Hojas:</u> necróticas.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.
P8	P55	<p><u>Tallo:</u> podredumbre en la base.</p> <p><u>Hojas:</u> manchas aceitosas.</p>	<p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria.
P9	P56	<p><u>Tallo:</u> estrechamiento en el tallo.</p> <p><u>Hojas:</u> amarilleamiento en el borde, puntos necróticos.</p> <p><u>Cotiledones:</u> manchas aceitosas.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hongo: <i>Pythium</i>. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria. - <i>Cladosporium</i>. <p>Cotiledones:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria. - <i>Cladosporium</i>.
P10	P57	<p><u>Tallo:</u> Rajado 3er entrenudo.</p> <p><u>Hojas:</u> punteado necrótico.</p>	<p>Tallo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>. <p>Hojas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Cladosporium</i>.

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (nº)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
P11	P58	<p><u>Tallo</u>: rajado 3er entrenudo. <u>Hojas</u>: punteado necrótico. <u>Cotiledones</u>: marchitez en el borde.</p>	<p>Tallo: - <i>Cladosporium</i>. Cotiledón: - Bacteria. - <i>Cladosporium</i>.</p>
P12	P59	<p><u>Tallo</u>: estrechamiento en su base. <u>Hojas</u>: puntos necróticos</p>	<p>Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria.</p>
P13	P60	<p><u>Tallo</u>: Rajado 1er entrenudo. <u>Cotiledones</u>: marchitez en el borde. <u>Hojas</u>: borde marchito.</p>	<p>Tallo: - Bacteria. - <i>Cladosporium</i>. Cotiledón: - Bacteria - <i>Cladosporium</i>.</p>
P14	P61	<p><u>Tallo</u>: Estrechamiento en su base. <u>Hojas</u>: marchitez en el borde.</p>	<p>Tallo: - Bacteria.</p>
P15	P62	<p><u>Tallo</u>: pudrición en el cuello. <u>Cotiledones</u>: manchas aceitosas. <u>Hojas</u>: manchas necróticas.</p>	<p>Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria. Raíz: - <i>Rhizoctonia</i>.</p>
P16	P63	<p><u>Cotiledones</u>: Manchas aceitosas. <u>Hojas</u>: Manchas necróticas.</p>	<p>Hojas: - <i>Cladosporium</i></p>
P17	P64	<p><u>Tallo</u>: Podrido desde la base hasta el 1er entrenudo. <u>Hojas</u>: Manchas necróticas.</p>	<p>Tallo: - Bacteria.</p>
P18	P65	<p><u>Tallo</u>: Podrido desde la base hasta cotiledones. <u>Hojas</u>: Manchas aceitosas.</p>	<p>Tallo: - Bacteria. Hojas: - Bacteria. - <i>Cladosporium</i>.</p>

NOMBRE DE LA PLANTA Código placa.	NOMBRE DE REGISTRO DE LA PLANTA (n°)	SINTOMATOLOGIA EN PLANTA	RESULTADOS EN LA PLACA
P19	P66	<u>Tallo:</u> podrido en la base del cuello, rajado en el 1er entrenudo. <u>Hojas:</u> Manchas necróticas.	Tallo: - Bacteria. Hojas: - <i>Cladosporium</i>
P20	P67	<u>Tallo:</u> Rajado 1 ^{er} al 2 ^o entrenudo. <u>Hojas:</u> Manchas necróticas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
P21	P68	<u>Tallo:</u> Pudrición. <u>Hojas:</u> Manchas aceitosas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> . Hojas: - Bacteria. - <i>Cladosporium</i> .
P22	P69	<u>Tallo:</u> rajado 2 lesiones. <u>Hojas:</u> aceitosas, puntos necróticos.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> Hojas: - <i>Cladosporium</i> . - Bacteria.
P23	P70	<u>Tallo:</u> Podredumbre en la base. <u>Cotiledones:</u> Manchas aceitosas.	Tallo: - Bacteria. Cotiledones: - Bacteria.
P24	P71	<u>Tallo:</u> Podredumbre en la base. <u>Hojas:</u> Manchas necróticas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> Hojas: - <i>Cladosporium</i> .
P36	P72	<u>Tallo:</u> Rajado múltiple 4 lesiones <u>Hojas:</u> manchas aceitosas.	Tallo: - <i>Cladosporium</i> Hojas: - <i>Cladosporium</i> . - Bacteria.

CUADRO 7: Resultados registrados en las placas procedentes del análisis de plántulas de melón.

1.2.2. Muestreo en semillas.

Los resultados que se obtuvieron en el análisis de semillas sobre medio de cultivo agarizado, fueron los que se muestran a continuación en el cuadro 8.

NÚMERO DE PLACA.	TOTAL DE SEMILLAS POR PLACA	RESULTADOS OBTENIDOS	
		HONGOS	Nº BACTERIA
1	10	5- <i>Aspergillus</i> 1- <i>Aspergillus</i> 4- <i>Penicillium</i>	2
2	10	3- <i>Aspergillus</i>	8
3	10	1- <i>Aspergillus</i> 1- <i>Aspergillus</i>	6
4	10	2- <i>Aspergillus</i>	6
5	10	3- <i>Aspergillus</i> 1- <i>Penicillium</i>	2
6	10	4- <i>Aspergillus</i>	3
7	10	1- <i>Aspergillus</i>	5
8	10	2- <i>Penicillium</i> 3- <i>Aspergillus</i>	3
9	10	<i>Penicillium</i>	4
10	10	2- <i>Aspergillus</i> .	2
TOTAL SEMILLAS		TOTAL BACTERIAS	
100		41	

CUADRO 8: resultados registrados en Placa Petri procedentes del análisis de semillas.

Con este resultado se observa, que de las 100 semillas analizadas, aparecieron un total de 41 bacterias.

2. LA ELECTROFORESIS RESULTADOS DE LA PCR.

Pasado el tiempo de tinción del gel con bromuro de etidio, y su posterior visión en la lámpara ultravioleta, se observaron los resultados que se muestran en la Figura 24.

En la figura se observa el fragmento de 1500pb correspondiente a la zona del genómico del ADNr 16S, de los distintos aislados analizados.

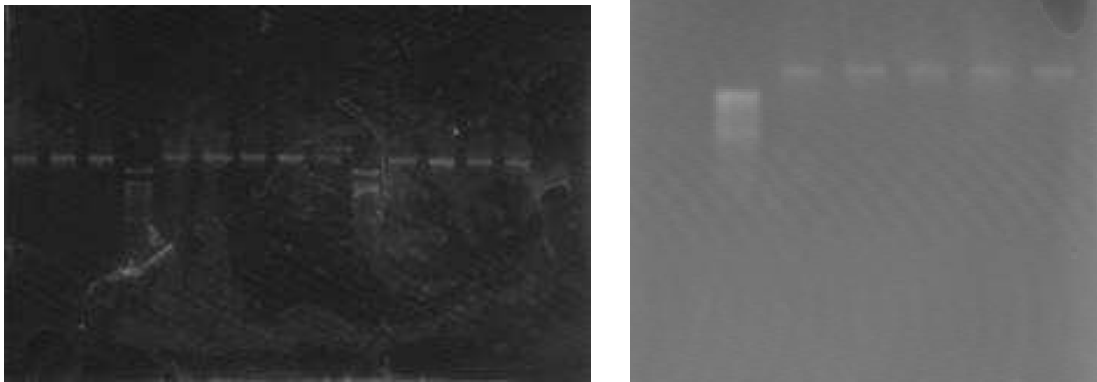


FIGURA 24: Resultados obtenidos de la tinción del gel, visto en la lámpara ultravioleta.

En cada uno de los pocillos se observa la banda de 1500pb correspondientes al ADNr 16 s de los distintos aislados encontrados en las semillas y plantas.

3. ANÁLISIS MOLECULAR.

Tras realizar el análisis molecular a las muestras bacterianas; 5, 6, 7 y 10 correspondiendo la muestra 5 a bacterias procedentes directamente de semillas y el resto siendo bacterias procedentes de material vegetal de las plántulas de melón y una vez hecha la purificación de fragmentos de PCR se obtuvieron los siguientes resultados.

3.1. Análisis molecular para la muestra 5.

Para la muestra 5 procedente de las bacterias localizadas de semilla de melón variedad Ricura, y una vez reordenada la secuenciación a través de programa Chroma Pro 1.5. y su posterior exportación al NCBI se obtuvo como resultado el cuadro 9 donde aparecen las bacterias con una gran similitud con nuestra bacteria muestra.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ905063.1	Uncultured bacterium clone THBP.0912.107 16S ribosomal RNA gene,	955	955	99%	0.0	95%
EU467917.1	Uncultured bacterium clone CE2_a08 16S ribosomal RNA gene, partia	955	955	99%	0.0	95%
EF204216.1	Delftia sp. H214 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
EF204215.1	Delftia sp. H213 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
EF204214.1	Delftia sp. H212 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
EF204213.1	Delftia sp. H209 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
EF204212.1	Delftia sp. H208 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
AF532869.1	Comamonas sp. D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	95%
HM273525.1	Uncultured bacterium clone ncd517e05c1 16S ribosomal RNA gene, p	950	950	99%	0.0	94%
EF565937.1	Comamonas sp. NF27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	924	924	99%	0.0	94%
JM128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	917	917	99%	0.0	93%
HM298901.1	Uncultured bacterium clone ncd902f09c1 16S ribosomal RNA gene, p	917	917	99%	0.0	93%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial sei	913	913	99%	0.0	93%
FJ946520.1	Uncultured Comamonas sp. clone LSS-E5 16S ribosomal RNA gene, p	911	911	99%	0.0	93%
AJ350282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene, isolate TK41	911	911	99%	0.0	93%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	907	907	99%	0.0	93%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	902	902	99%	0.0	93%
JF690938.1	Comamonas sp. MZ_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	99%	0.0	93%
EF565937.1	Comamonas sp. NF27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	924	924	99%	0.0	94%
JM128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	917	917	99%	0.0	93%
HM298901.1	Uncultured bacterium clone ncd902f09c1 16S ribosomal RNA gene, p	917	917	99%	0.0	93%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial sei	913	913	99%	0.0	93%
FJ946520.1	Uncultured Comamonas sp. clone LSS-E5 16S ribosomal RNA gene, p	911	911	99%	0.0	93%
AJ350282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene, isolate TK41	911	911	99%	0.0	93%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	907	907	99%	0.0	93%
EF565937.1	Comamonas sp. NF27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	924	924	99%	0.0	94%
JM128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	917	917	99%	0.0	93%
HM298901.1	Uncultured bacterium clone ncd902f09c1 16S ribosomal RNA gene, p	917	917	99%	0.0	93%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial sei	913	913	99%	0.0	93%
FJ946520.1	Uncultured Comamonas sp. clone LSS-E5 16S ribosomal RNA gene, p	911	911	99%	0.0	93%
AJ350282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene, isolate TK41	911	911	99%	0.0	93%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	907	907	99%	0.0	93%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	902	902	99%	0.0	93%
JF690938.1	Comamonas sp. MZ_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	99%	0.0	93%
JF218140.1	Uncultured bacterium clone ncd2540d08c1 16S ribosomal RNA gene,	889	889	99%	0.0	93%
JF209871.1	Uncultured bacterium clone ncd2414d11c1 16S ribosomal RNA gene,	889	889	99%	0.0	93%
JF200954.1	Uncultured bacterium clone ncd2413g04c1 16S ribosomal RNA gene,	889	889	99%	0.0	93%
HM365953.1	Comamonas sp. RV_A09_23b 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	889	889	99%	0.0	93%
GQ069777.1	Uncultured bacterium clone nbw233a08c1 16S ribosomal RNA gene, i	889	889	99%	0.0	93%
FM874442.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MDO2G01	889	889	99%	0.0	93%
AB592881.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: M	887	887	93%	0.0	94%
DQ228718.2	Uncultured Comamonas sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	887	887	99%	0.0	93%
DQ070859.1	Uncultured Comamonas sp. clone nmt ct4 16S ribosomal RNA gene, p	887	887	99%	0.0	93%
GQ206315.1	Uncultured Comamonas sp. clone 4A1H6C9 16S ribosomal RNA gene,	883	883	99%	0.0	92%
AF078773.1	Comamonas sp. 12022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	883	883	99%	0.0	92%
FN421882.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 2_F07	881	881	97%	0.0	93%
GU472939.1	Uncultured Polaromonas sp. clone Bfa98 16S ribosomal RNA gene, pa	878	878	99%	0.0	92%
EU463101.1	Uncultured bacterium clone molerat_iai69h06 16S ribosomal RNA gen	878	878	99%	0.0	92%
AM697253.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001C094	878	878	99%	0.0	92%
JF915328.1	Comamonas koreensis strain NW116 16S ribosomal RNA gene, partial	876	876	97%	0.0	93%
JF915327.1	Comamonas koreensis strain NW15 16S ribosomal RNA gene, partial s	876	876	97%	0.0	93%
JF722672.1	Comamonas sp. J1-Soil-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	872	872	99%	0.0	92%
HQ893540.1	Comamonas aquatica strain MR 82 16S ribosomal RNA gene, partial s	872	872	99%	0.0	92%

CUADRO 9: Posibles bacterias resultado de la muestra número 5.

Como se puede observar en el Cuadro 9 las bacterias a destacar corresponden al género *Delftia* y *Comamonas* con una identidad máxima del 95 y 93% respectivamente. Dentro del género *Comamonas* destacan las especies *korrensis* 93% y *Comamonas aquatica* en el 92%.

3.1.1. Análisis molecular de la muestra 5 (cadena complementaria).

Repetiendo el mismo análisis para la cadena complementaria 5-pH cedida por secuenciación se obtuvo los resultados presentes en el cuadro 10.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF532869.1	Comamonas sp. D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	100%	0.0	95%
AJ550282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene isolate TK41	955	955	100%	0.0	95%
NR_025107.1	Comamonas korensis strain KCTC 12005 16S ribosomal RNA, partial	952	952	100%	0.0	95%
FM874442.1	Uncultured beta proteobacterium clone z-150 16S ribosomal RNA gene	950	950	100%	0.0	95%
FM874442.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MD02G01	950	950	100%	0.0	95%
EU088045.1	Endophytic bacterium WL6b 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	950	950	100%	0.0	95%
JN128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	933	933	98%	0.0	95%
AM697253.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001C094	933	933	100%	0.0	95%
HQ902633.1	Uncultured bacterium clone JB9 16S ribosomal RNA gene, partial seq	928	928	100%	0.0	94%
EU515237.1	Comamonas sp. CY 01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	922	922	100%	0.0	94%
GQ206315.1	Uncultured Comamonas sp. clone 4A1H6C9 16S ribosomal RNA gene,	917	917	100%	0.0	94%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	915	915	100%	0.0	94%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	915	915	100%	0.0	94%
AF418949.1	Uncultured bacterium clone HTB86 16S ribosomal RNA gene, partial s	915	915	100%	0.0	94%
AF078773.1	Comamonas sp. 12022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	99%	0.0	94%
FN421882.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 2_F07	909	909	100%	0.0	94%
HM365953.1	Comamonas sp. RV_A09_23b 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	907	907	95%	0.0	95%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial se	905	905	100%	0.0	94%
AB187586.1	Comamonas granulii gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ko0	900	900	100%	0.0	94%
AY491629.1	Uncultured bacterium clone oca35 16S ribosomal RNA gene, partial s	896	896	100%	0.0	93%
JF808870.1	Uncultured Comamonas sp. clone R15-81 16S ribosomal RNA gene, p	894	894	100%	0.0	93%
JF808869.1	Uncultured Comamonas sp. clone R15-59 16S ribosomal RNA gene, p	894	894	100%	0.0	93%
JF697496.1	Uncultured bacterium clone reservoir-115 16S ribosomal RNA gene, r	894	894	100%	0.0	93%
GQ260128.2	Acidovorax konjaci strain BC2944 16S ribosomal RNA gene, partial se	894	894	100%	0.0	93%
FN794215.1	Comamonas sp. V2M3 partial 16S rRNA gene, strain V2M3	894	894	100%	0.0	93%
GU290321.1	Comamonas sp. 200914 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	894	894	100%	0.0	93%
EU917638.1	Uncultured bacterium clone CrustH09 16S ribosomal RNA gene, parti	894	894	100%	0.0	93%
HQ902633.1	Uncultured bacterium clone JB9 16S ribosomal RNA gene, partial seq	928	928	100%	0.0	94%
EU515237.1	Comamonas sp. CY 01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	922	922	100%	0.0	94%
GQ206315.1	Uncultured Comamonas sp. clone 4A1H6C9 16S ribosomal RNA gene,	917	917	100%	0.0	94%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	915	915	100%	0.0	94%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	915	915	100%	0.0	94%
AF418949.1	Uncultured bacterium clone HTB86 16S ribosomal RNA gene, partial s	915	915	100%	0.0	94%
AF078773.1	Comamonas sp. 12022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	913	913	99%	0.0	94%
FN421882.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 2_F07	909	909	100%	0.0	94%
HM365953.1	Comamonas sp. RV_A09_23b 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	907	907	95%	0.0	95%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial se	905	905	100%	0.0	94%
AB187586.1	Comamonas granulii gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ko0	900	900	100%	0.0	94%
AY491629.1	Uncultured bacterium clone oca35 16S ribosomal RNA gene, partial s	896	896	100%	0.0	93%
JF808870.1	Uncultured Comamonas sp. clone R15-81 16S ribosomal RNA gene, p	894	894	100%	0.0	93%
JF808869.1	Uncultured Comamonas sp. clone R15-59 16S ribosomal RNA gene, p	894	894	100%	0.0	93%
JF697496.1	Uncultured bacterium clone reservoir-115 16S ribosomal RNA gene, r	894	894	100%	0.0	93%
GQ260128.2	Acidovorax konjaci strain BC2944 16S ribosomal RNA gene, partial se	894	894	100%	0.0	93%
FN794215.1	Comamonas sp. V2M3 partial 16S rRNA gene, strain V2M3	894	894	100%	0.0	93%
GU290321.1	Comamonas sp. 200914 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	894	894	100%	0.0	93%
EU917638.1	Uncultured bacterium clone CrustH09 16S ribosomal RNA gene, parti	894	894	100%	0.0	93%
EU104087.1	Uncultured bacterium clone M0111_93 16S ribosomal RNA gene, part	894	894	100%	0.0	93%
EU841517.1	Comamonas aquatica strain 339 16S ribosomal RNA gene, partial seq	894	894	100%	0.0	93%
AB430332.1	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence,	894	894	100%	0.0	93%
DQ532322.1	Uncultured bacterium clone KSC4-7 16S ribosomal RNA gene, partial	894	894	100%	0.0	93%
DQ446000.1	Uncultured beta proteobacterium clone SML_216_10 16S ribosomal F	894	894	99%	0.0	93%
AM184229.1	Comamonas terrigena partial 16S rRNA gene, strain WAB1888	894	894	100%	0.0	93%
AF137507.1	Acidovorax konjaci 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	894	894	100%	0.0	93%
AJ430343.1	Comamonas terrigena partial 16S rRNA gene, strain LMG 1249	894	894	100%	0.0	93%
AF078763.1	Acidovorax sp. IMI 357678 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	894	894	100%	0.0	93%
EU652485.1	Hydrogenophaga sp. JPB-3.10 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	891	891	100%	0.0	93%
JF817600.1	Uncultured Acidovorax sp. clone MFCBoq3-51 16S ribosomal RNA gen	889	889	100%	0.0	93%

CUADRO 10: Resultados para la muestra número 5, correspondientes a la cadena de ADN complementaria.

Al igual que en el caso anterior nos encontramos bacterias del género *Comamonas sp.* Con una identidad máxima de 95% en la especie *koreensis* y también hay resultados para el género *Acidorovax* con una identidad máxima del 95 a 93%.

3.2. Análisis molecular para la muestra 6.

Para la muestra 6 procedente de las bacterias localizadas de semilla de melón variedad Ricura, y una vez reordenada la secuenciación a través de programa Chroma Pro 1.5. y su posterior exportación al NCBI se obtuvo como resultado el cuadro 11 donde aparecen las bacterias con una gran similitud con nuestra bacteria muestra.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ652605.1	<i>Stenotrophomonas sp.</i> p22(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial se	1074	1074	99%	0.0	96%
HM748056.1	<i>Stenotrophomonas sp.</i> ICB385 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	1074	1074	98%	0.0	96%
HM325030.1	Uncultured bacterium clone ncd437c05c1 16S ribosomal RNA gene, p	1074	1074	99%	0.0	96%
EF511479.1	Uncultured bacterium clone P5D15-471 16S ribosomal RNA gene, par	1074	1074	99%	0.0	96%
AY162068.1	Gamma proteobacterium PII_GH4.2.G5 small subunit ribosomal RNA q	1074	1074	99%	0.0	96%
AY162052.1	Gamma proteobacterium PI_GH4.1.G2 small subunit ribosomal RNA ge	1074	1074	99%	0.0	96%
FJ626647.1	<i>Stenotrophomonas sp.</i> MH128 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1070	1070	99%	0.0	96%
AJ131916.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , 16S rRNA gene, strain LMG 11002	1070	1070	99%	0.0	96%
JN033056.1	Uncultured bacterium clone 3-42035 16S ribosomal RNA gene, partia	1068	1068	99%	0.0	96%
FJ508325.1	Uncultured bacterium clone 16slp83-08h04.p1k 16S ribosomal RNA q	1068	1068	99%	0.0	96%
HQ671069.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain JKR32b 16S ribosomal RNA gene	1068	1068	99%	0.0	96%
HM010797.1	Uncultured bacterium clone FedNymph35 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HQ246221.1	<i>Pseudomonas sp.</i> 2A9S6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1068	1068	99%	0.0	96%
HQ246220.1	<i>Stenotrophomonas sp.</i> 2A9S2 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1068	1068	99%	0.0	96%
HM462353.1	Uncultured <i>Stenotrophomonas sp.</i> clone PtW-II-cl9 16S ribosomal RI	1068	1068	99%	0.0	96%
HM143858.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain AhsB4 16S ribosomal RNA gene,	1068	1068	99%	0.0	96%
HM186762.1	Uncultured bacterium clone HDB_SIOZ453 16S ribosomal RNA gene, I	1068	1068	99%	0.0	96%
HM186705.1	Uncultured bacterium clone HDB_SIOU428 16S ribosomal RNA gene, I	1068	1068	99%	0.0	96%
HM186618.1	Uncultured bacterium clone HDB_SIOT1789 16S ribosomal RNA gene,	1068	1068	99%	0.0	96%
HM334984.1	Uncultured bacterium clone ncd994q01c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM334496.1	Uncultured bacterium clone ncd987f01c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM314910.1	Uncultured bacterium clone ncd437h09c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM309167.1	Uncultured bacterium clone ncd910b10c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM276202.1	Uncultured bacterium clone ncd519e07c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM265311.1	Uncultured bacterium clone ncd183f08c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM265273.1	Uncultured bacterium clone ncd183c01c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
HM253509.1	Uncultured bacterium clone ncd45d07c1 16S ribosomal RNA gene, p	1068	1068	99%	0.0	96%
GU569151.1	Uncultured <i>Stenotrophomonas sp.</i> clone UBXB8 16S ribosomal RNA q	1068	1068	99%	0.0	96%
GU563744.1	Uncultured bacterium clone CHINA11 16S ribosomal RNA gene, partia	1068	1068	99%	0.0	96%
GU563742.1	Uncultured <i>Stenotrophomonas sp.</i> clone CHINA59 16S ribosomal RNA	1068	1068	99%	0.0	96%

CUADRO 11: Resultados de la cadena de ADN correspondiente a la muestra 6.

Como se observa para esta muestra se ha obtenido como resultado bacterias del género *Stenotrophomonas sp.* Con una identidad máxima del 96%.

3.2.1. Análisis molecular para la muestra 6 de su cadena complementaria 6-pH.

Se utilizó la cadena complementaria de ADN de la muestra 6 para dar lugar a los siguientes resultados.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF511770.1	Uncultured bacterium clone P5D23-633 16S ribosomal RNA gene, par	1018	1018	99%	0.0	95%
GQ267816.1	Stenotrophomonas maltophilia strain PSM-5 16S ribosomal RNA gene	1016	1016	99%	0.0	95%
EF511450.1	Uncultured bacterium clone P5D15-639 16S ribosomal RNA gene, par	1016	1016	99%	0.0	95%
GQ280904.1	Stenotrophomonas maltophilia strain FF111 16S ribosomal RNA gene,	1014	1014	99%	0.0	95%
EU931549.1	Stenotrophomonas maltophilia strain ZFJ-10 16S ribosomal RNA gene	1014	1014	99%	0.0	95%
EF511812.1	Uncultured bacterium clone P5D23-435 16S ribosomal RNA gene, par	1014	1014	99%	0.0	95%
EF511711.1	Uncultured bacterium clone P5D23-459 16S ribosomal RNA gene, par	1014	1014	99%	0.0	95%
EF511676.1	Uncultured bacterium clone P5D23-620 16S ribosomal RNA gene, par	1014	1014	99%	0.0	95%
EF511505.1	Uncultured bacterium clone P5D15-442 16S ribosomal RNA gene, par	1014	1014	99%	0.0	95%
EF509771.1	Uncultured bacterium clone P4D1-571 16S ribosomal RNA gene, parti	1014	1014	99%	0.0	95%
EF509709.1	Uncultured bacterium clone P4D1-518 16S ribosomal RNA gene, parti	1014	1014	99%	0.0	95%
EF509747.1	Uncultured bacterium clone P4D1-742 16S ribosomal RNA gene, parti	1013	1013	99%	0.0	95%
AJ305833.1	Stenotrophomonas maltophilia 16S rRNA gene, isolate ON2	1013	1013	99%	0.0	95%
JN019029.1	Stenotrophomonas maltophilia strain RB5-M6 16S ribosomal RNA gene	1011	1011	99%	0.0	95%
HQ610659.1	Uncultured bacterium clone yf2clone70 16S ribosomal RNA gene, par	1011	1011	99%	0.0	95%
HQ403023.1	Uncultured bacterium clone fb103 16S ribosomal RNA gene, partial se	1011	1011	99%	0.0	95%
HQ200414.1	Stenotrophomonas maltophilia strain Dh 16S ribosomal RNA gene, pa	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ476444.1	Uncultured bacterium clone 1408-M13F-2 16S ribosomal RNA gene, p	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ206319.1	Uncultured Stenotrophomonas sp. clone A6H6M9 16S ribosomal RNA	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ478276.1	Stenotrophomonas sp. B4M-T 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ478270.1	Stenotrophomonas sp. R4M-R 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1011	1011	99%	0.0	95%
GU451210.1	Uncultured bacterium clone A4H1M9 16S ribosomal RNA gene, partial	1011	1011	99%	0.0	95%
GU362880.1	Pseudomonas sp. JY-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ179712.1	Uncultured Stenotrophomonas sp. clone VE12C08 16S ribosomal RNA	1011	1011	99%	0.0	95%
GQ127873.1	Uncultured bacterium clone BACd-5E10 16S ribosomal RNA gene, par	1011	1011	99%	0.0	95%
FJ906801.1	Stenotrophomonas maltophilia strain PSM-2 16S ribosomal RNA gene	1011	1011	99%	0.0	95%
FJ765513.1	Stenotrophomonas maltophilia strain YHYJ-1 16S ribosomal RNA gene	1011	1011	99%	0.0	95%
FJ712028.1	Bacterium EMS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1011	1011	99%	0.0	95%
FJ626655.1	Stenotrophomonas sp. MH107 16S ribosomal RNA gene, partial seque	1011	1011	99%	0.0	95%

CUADRO 12: Resultados de la cadena complementaria 6-pH, correspondiente a la muestra 6.

En el cuadro 12 se recogen los resultados obtenidos en los cuales aparece como la bacteria *Stenotrophomonas sp.* Como género de la enfermedad de las plántulas de melón.

No obstante se siguió haciendo análisis moleculares a distintas muestras, las cuales son mostradas a continuación.

3.3. Análisis molecular de la muestra 7.

La muestra 7 procedente de las bacterias localizadas de semilla de melón variedad Ricura, y una vez reordenada la secuenciación a través de programa Chroma Pro 1.5. y su posterior exportación al NCBI se obtuvo como resultado el cuadro 13 donde aparecen las bacterias con una gran similitud con nuestra bacteria muestra.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
HQ905063.1	Uncultured bacterium clone THBP.0912.107 16S ribosomal RNA gene,	1186	1186	100%	0.0	99%
EU467917.1	Uncultured bacterium clone CE2_a08 16S ribosomal RNA gene, partia	1186	1186	100%	0.0	99%
EF204216.1	Delftia sp. H214 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
EF204215.1	Delftia sp. H213 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
EF204214.1	Delftia sp. H212 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
EF204213.1	Delftia sp. H209 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
EF204212.1	Delftia sp. H208 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
AF532869.1	Comamonas sp. D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1186	1186	100%	0.0	99%
HM273525.1	Uncultured bacterium clone ncd517e05c1 16S ribosomal RNA gene, p	1181	1181	100%	0.0	98%
EF565937.1	Comamonas sp. NF27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1155	1155	100%	0.0	98%
JN128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1147	1147	100%	0.0	98%
HM298901.1	Uncultured bacterium clone ncd902f09c1 16S ribosomal RNA gene, p	1147	1147	100%	0.0	98%
AJ550282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene, isolate TK41	1142	1142	100%	0.0	97%
FJ946520.1	Uncultured Comamonas sp. clone LSS-E5 16S ribosomal RNA gene, p	1136	1136	100%	0.0	97%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial se	1133	1133	100%	0.0	97%
JF218140.1	Uncultured bacterium clone ncd2540d08c1 16S ribosomal RNA gene,	1125	1125	100%	0.0	97%
JF209871.1	Uncultured bacterium clone ncd2414d11c1 16S ribosomal RNA gene,	1125	1125	100%	0.0	97%
JF200954.1	Uncultured bacterium clone ncd2413q04c1 16S ribosomal RNA gene,	1125	1125	100%	0.0	97%
GQ206315.1	Uncultured Comamonas sp. clone 4A1H6C9 16S ribosomal RNA gene,	1125	1125	100%	0.0	97%
GQ069777.1	Uncultured bacterium clone nbw233a08c1 16S ribosomal RNA gene, I	1125	1125	100%	0.0	97%
FM874442.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MD02G01	1125	1125	100%	0.0	97%
DQ228718.2	Uncultured Comamonas sp. 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1125	1125	100%	0.0	97%
DQ070859.1	Uncultured Comamonas sp. clone nmt ct4 16S ribosomal RNA gene, I	1125	1125	100%	0.0	97%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	1122	1122	100%	0.0	97%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	1116	1116	100%	0.0	97%
AM697253.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001C094	1114	1114	100%	0.0	97%
EU463101.1	Uncultured bacterium clone molerat_aai69h06 16S ribosomal RNA ge	1103	1103	100%	0.0	96%
AF078773.1	Comamonas sp. 12022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1103	1103	100%	0.0	96%
NR_025107.1	Comamonas koreensis strain KCTC 12005 16S ribosomal RNA, partial	1099	1099	100%	0.0	96%
GU472943.1	Uncultured Variovorax sp. clone Bfa107 16S ribosomal RNA gene, nar	1098	1098	100%	0.0	96%

CUADRO 13: Resultados obtenidos para la muestra número 7.

En el cuadro 13, se recogen los resultados obtenidos para la muestra número 7, la bacteria presente en este ensayo ha sido *Comamonas sp.* Con un 99% de identidad máxima.

3.3.1. Muestra 7, cadena complementaria de ADN 7-pH.

Se utilizó la cadena complementaria de ADN de la muestra 7 para dar lugar a los siguientes resultados mostrados en el cuadro 14.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FM874442.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MD02G01	1002	1002	99%	0.0	96%
EU088045.1	Endophytic bacterium WL6b 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	1000	1000	99%	0.0	96%
NR_025107.1	Comamonas koreensis strain KCTC 12005 16S ribosomal RNA, partial	998	998	99%	0.0	95%
AF532869.1	Comamonas sp. D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	996	996	99%	0.0	95%
AJ550282.1	Comamonas sp. TK41 partial 16S rRNA gene, isolate TK41	992	992	98%	0.0	95%
HQ224901.1	Uncultured beta proteobacterium clone 2-150 16S ribosomal RNA gei	990	990	99%	0.0	95%
HQ902633.1	Uncultured bacterium clone JB9 16S ribosomal RNA gene, partial seq	979	979	99%	0.0	95%
AM697253.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate BF0001C094	979	979	99%	0.0	95%
GQ206315.1	Uncultured Comamonas sp. clone 4A1H6C9 16S ribosomal RNA gene,	966	966	99%	0.0	95%
GQ451264.1	Uncultured bacterium clone J240 16S ribosomal RNA gene, partial se	966	966	99%	0.0	94%
EU344924.1	Uncultured Comamonas sp. clone Hq4-15 16S ribosomal RNA gene, p	966	966	99%	0.0	94%
EF679183.1	Uncultured bacterium clone ASP-7 16S ribosomal RNA gene, partial s	966	966	99%	0.0	94%
AF418949.1	Uncultured bacterium clone HTBB6 16S ribosomal RNA gene, partial s	966	966	99%	0.0	94%
JN128832.1	Comamonas sp. B-9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequenci	963	963	94%	0.0	96%
EU515237.1	Comamonas sp. CY 01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	963	963	96%	0.0	96%
AF078773.1	Comamonas sp. 12022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	955	955	99%	0.0	94%
EU841530.1	Comamonas aquatica strain 634 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841529.1	Comamonas aquatica strain 617 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841528.1	Comamonas aquatica strain 532 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841527.1	Comamonas aquatica strain 530 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841526.1	Comamonas aquatica strain 525 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841525.1	Comamonas aquatica strain 519 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841524.1	Comamonas aquatica strain 510 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841523.1	Comamonas aquatica strain 503 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841521.1	Comamonas aquatica strain 431 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841518.1	Comamonas aquatica strain 403 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841516.1	Comamonas aquatica strain 337 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841515.1	Comamonas aquatica strain 336 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841514.1	Comamonas aquatica strain 334 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841513.1	Comamonas aquatica strain 319 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841512.1	Comamonas aquatica strain 318 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841511.1	Comamonas aquatica strain 317 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841510.1	Comamonas aquatica strain 239 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841509.1	Comamonas aquatica strain 118 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU841508.1	Comamonas aquatica strain 117 16S ribosomal RNA gene, partial seq	946	946	99%	0.0	94%
EU800469.1	Uncultured bacterium clone 2C228581 16S ribosomal RNA gene, part	946	946	99%	0.0	94%
EF426453.1	Comamonas sp. L11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	946	946	99%	0.0	94%
EU252489.1	Comamonas sp. AM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	946	946	99%	0.0	94%

CUADRO 14: Resultados obtenidos de la muestra 7, con su cadena de ADN complementaria.

Como se aprecia en el cuadro 14 las bacterias que predominan en el resultado de tal análisis son del género *Comamonas koreensis* con un 95% de identidad máxima y *Comamonas aquatica* con un 94% de identidad máxima.

3.4. Análisis de la muestra 10.

La muestra 10 procedente de las bacterias localizadas de semilla de melón variedad Ricura, y una vez reordenada la secuenciación a través de programa Chroma Pro 1.5. y su posterior exportación al NCBI se obtuvo como resultado el cuadro 15 donde aparecen las bacterias con una gran similitud con nuestra bacteria muestra.

EF446175.1	Uncultured bacterium clone filnov03d5 16S ribosomal RNA gene, part	477	477	88%	3e-131	88%
EF446174.1	Uncultured bacterium clone filnov03d3 16S ribosomal RNA gene, part	477	477	88%	3e-131	88%
AB176232.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176230.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176227.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176192.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176188.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176174.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
AB176171.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: S:	477	477	88%	3e-131	88%
DQ303264.1	Uncultured bacterium clone fq3 16S ribosomal RNA gene, partial seq	477	477	88%	3e-131	88%
JF914329.1	Uncultured bacterium clone G73 16S ribosomal RNA gene, partial seq	475	475	80%	9e-131	90%
JF799965.1	Acinetobacter sp. K7SC-11A 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	475	475	80%	9e-131	90%
JF733286.1	Acinetobacter sp. K7SC-8A 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	475	475	80%	9e-131	90%
JF343128.1	Acinetobacter sp. IARI-CS-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	475	475	87%	9e-131	88%
JH256112.2	Uncultured bacterium clone EZSDV 16S ribosomal RNA gene, partial :	475	475	86%	9e-131	90%

CUADRO 15: Resultados obtenidos para la muestra 10.

El género bacteriano que predomina en los resultados de esta muestra es el *Acinetobacter sp.* Con una identidad máxima del 88%.

4. DISCUSIONES.

Teniendo en cuenta todos los resultados de los muestreos de placas, y conociendo los géneros bacterianos y demás hongos presentes podemos llegar a la siguiente discusión.

Las plántulas estudiadas procedentes del semillero “El Plantel”, las cuales presentaban diferentes fisiopatías, así como daños externos han mostrado en el análisis del material vegetal sobre medio agarizado en cada una de las plántulas, una serie de hongos y bacterias. Así como en el caso de las semillas, recordando que de 100 semillas estudiadas, 41 de ellas presentaron síntomas bacterianos. Además por las características organolépticas del agua de riego presentaba un olor característico a pudrición característico al género *Comamonas* sp.

Se puede decir de los resultados obtenidos que no nos aseguran completamente un género y especie concreto, puesto que los géneros obtenidos *Comamonas*, *Acidovorax*, *Stenotrophomonas* sp y *Defttia* presentaron una identidad en todos sus casos superior al 88% llegando en algunos casos al 99% como es el caso de *Comamonas* sp. en la muestra número 7.

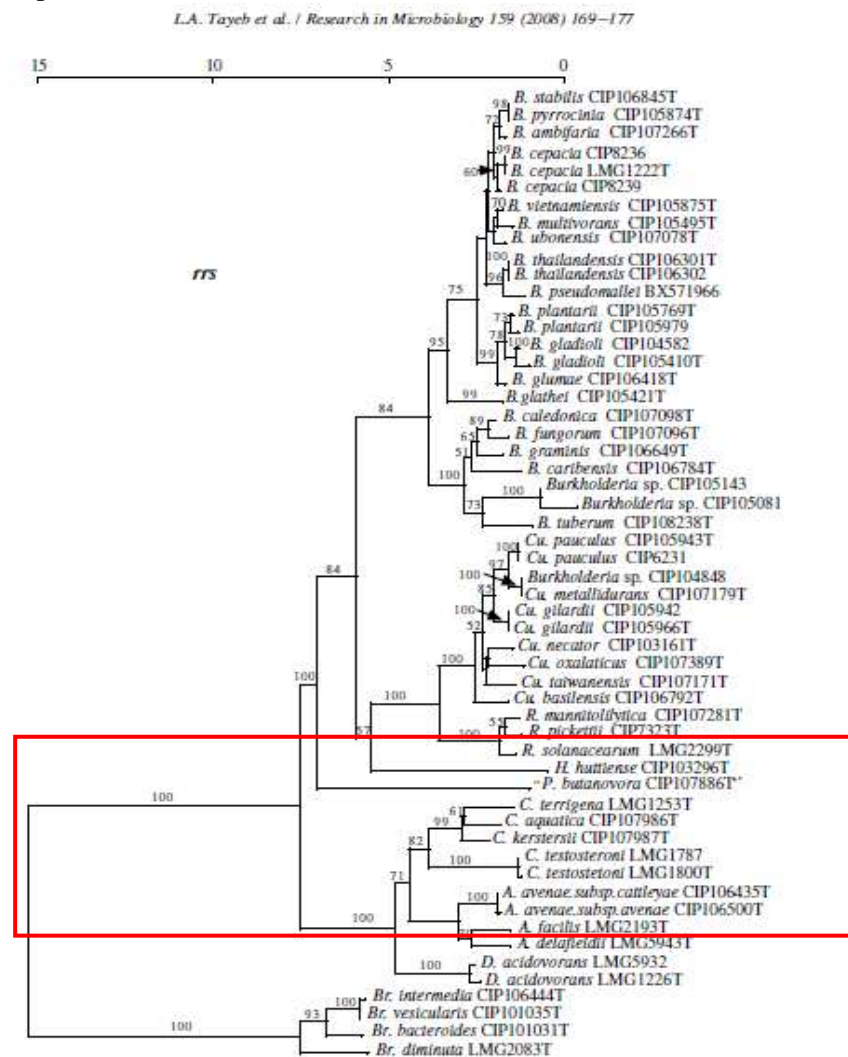


FIGURA 25: Esquema general de ordenación de las bacterias según sus 100 pares de bases.

Sin poder afirmar que esta sea el causante de la enfermedad de citadas plántulas, entre varios aspectos es debido a la proximidad en el árbol genético bacteriano que presentan estos cuatro géneros estando muy próximos entre sí, figura 25 y 26, es decir, con características genéticas muy semejantes y la identidad obtenida para cada uno de ellos no supera en ningún caso el 100%, originando en las plántulas de melón sintomatologías parecidas.

Además de las bacterias anteriormente citadas, en los resultados también se observó la presencia de hongos tales como *Cladosporium cucumerinum*, *Pythium aphanidermatum*, *Didymella Bryoniae* y *Rhizoctonia solani* siendo específicos para cucurbitáceas, en especial para melón.(Camacho F. 2003)

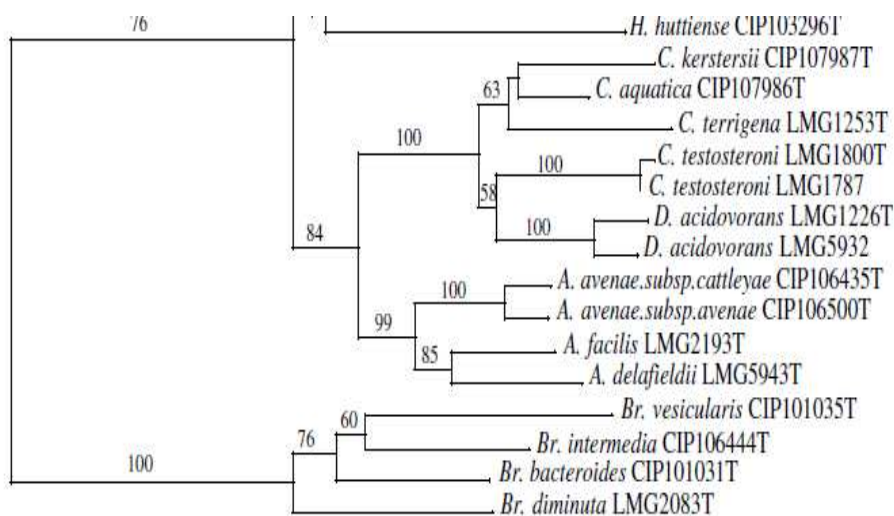


FIGURA 26: Detalle del esquema general de clasificación bacteriana.

V. CONCLUSIONES.

Tras el análisis de los resultados obtenidos a partir de la evaluación realizada a lo largo de todo el proceso en el cual se ha llevado a cabo el diagnóstico fitopatológico, se han obtenido una serie de conclusiones que se citan a continuación.

1. El agente principal causante de la enfermedad ha sido *Cladosporium cucumerinum*. No se descarta que el problema patológico sea de etiología compleja debido a la presencia de bacterias del género *Comamonas sp.* en semilla.
2. La identificación de las bacterias presente en las muestras mediante el análisis del ADNr 16S no ha permitido la identificación concreta de una especie, debido al bajo porcentaje de similitud encontrado.
3. Además, en este problema fitopatológico se han detectado especies de hongos tales como, *Pythium aphanidermatum*, *Didymella Bryoniais* y *Rhizoctonia solani* especies típicas detectadas en semillero.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

AVILÉS M, TELLO J.C. 2002 Revista Horticom Capítulo X: Control sanitario de los semilleros hortícolas pág.: 129-137

BRAVO CAPARRÓS D. 2009. Efecto del lavado de compost para sustrato de semillero sobre la capa germinativa en sandía y melón. Proyecto Fin de Carrera. Universidad de Almería.

CAJA RURAL (2010): http://www.ruralcaja.org/descarga/portainj_melon.pdf

CAMACHO FERRE F. TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN EN CULTIVOS PROTEGIDOS, 2003. Instituto Cajamar. Almería TOMO 1 pág.210-216, TOMO 2 pág.: 457-459

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA. 2010. Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera. Junta de Andalucía. España

<http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/obsprecios/servlet/FrontController>.
<http://www.juntadeandalucia.es/boja/boletines/2009/157/d/27.html>.

EL PLANTEL, SEMILLEROS 2011. www.elplantelsemilleros.com

FAO (2002). Dirección de producción y protección vegetal 90. Manual preparado por el grupo de cultivos hortícolas. Dirección de producción y protección vegetal. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Capítulo 6.

FERNÁNDEZ I. (2010), Rijk Zwaan muestra todas su variedades de melón en su “Semana Internacional”. FhAlmería Junio 2010, nº 31, pág. 3.

FERNÁNDEZ LAVANDERA, O. y PIZARRO CHECA, A. (1981): “Almería: la técnica del enarenado transforma un desierto”. Revista de Estudios Agrosociales. nº 115. pp. 31-70.

FERNÁNDEZ. M, GÓMEZ J. 1993. Horticultura global: Revista de industria, distribución y socioeconómica hortícola, N° 90 pág. 32-47.

GAMAYO DÍAZ J.D., (2000) Plagas y enfermedades del melón. Cultivos intensivos. Pág. 58-62.

GARCÉS FIALLOS F.R., MELO REIS E. (2009) . Control de bacteriosis en el cultivo de melón. Unidad Técnica Estatal de Quevedo (Brasil), Unidad de investigación Científica y Tecnológica.

GARCÍA-JIMÉNEZ J. , VELÁZQUEZ M.T., ALFARO A. (1989) Boletín de sanidad vegetal Plagas, 4: 333-342.

GUIRAO P., PEREZ GARCÍA J.J., CENÍS ANADÓN J.J., SANCHEZ ESCRIBANO E.M., GARCÍA J. (1996) Revista Agropecuaria N° 766, Biología molecular aplicada a la hortofruticultura. La técnica PCR pág.: 401

GUZMAN J.M., 2002. 2º simposio Nacional de Horticultura. Conferencias y cursos sobre nutrición de cultivos hortícolas. X. Acondicionamiento nutritivo en semilleros y respuestas postrasplante en hortalizas.

HORTICOM (2011). www.horticom.com. Junio 2011.

JUNTA DE ANDALUCÍA (2009) Balance estadístico, Secretaría general del medio Rural y de la Producción Ecológica

Ley 30/2006, de 26 de julio, de semillas y plantas de vivero y de recursos fitogenéticos

MARM, 2010. Estadísticas. Avances de superficies y producciones de cultivos. España.

http://www.marm.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_hortint%2Fhortint_2003_4_2_30_36.pdf

MARTÍNEZ-RESTOY R.E, DIÁNEZ F., SANTOS M., DE CARA M., FERRANDIZ HERNANDEZ J., TELLO J.C.(2006) Boletín de Sanidad Vegetal Plagas, Nº 32 pág.: 673-683

NAVARRO, E. M. (2008) Influencia de las alteraciones textural del suelo sobre la calidad del melón galia cultivado en invernadero. Tesis Doctoral. Universidad de Almería, Universidad de Granada.

RIJKZ WAAN, Casa de semillas 20110: www.rijkszwaan.es

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., EHRLICH, H.A.1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239:487-491.

SAMBROOK, J, MANIATIS, T., AND FRISCH, E. F. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor, USA

TAYEB L.A., LEFEVRE M., PASSET V., DIANCOURT L., BRISSE S., GRIMONT P. (2008) Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences.. Institut Pasteur. Research in Microbiology 159, pág. 169-177

TELLO, J.C. 2003. Evolución de las enfermedades hortícolas en el sureste español. Perspectivas de futuro y alternativas a las aplicaciones fitosanitarias actuales. En: Técnicas de producción en cultivos protegidos. Tomo 1. Ed: Caja Rural Intermediterránea, Cajamar, Almería. 373 pp.

ZARRILLI, A. (2003). La Huerta de Europa. Revista de estudios rurales, vol. 4 nº 7. Centro de Estudios Históricos Rurale. Mundo agrario. Obtenido el 26/04/2011 en: <http://redalyc.uaemex.mx>