

Una técnica novedosa e inocua

## Aplicación de microondas para la erradicación de la **Fusariosis del Melón**

M.L. Soriano-Martin \*  
A. Porras-Piedra \*  
O. Martín-Sánchez \*  
A. Porras-Soriano \*  
D. Martín-Sánchez \*  
M.L. Porras-Soriano \*



El organismo responsable de la Fusariosis vascular del melón (*Cucumis melo*), el hongo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, puede ser erradicado mediante la aplicación de la energía producida por un microondas comercial de 2.45 GHz de frecuencia.

La técnica ensayada, además de ser una técnica novedosa y atractiva para la erradicación de este patógeno, constituye un proceso inocuo, no destructivo, rápido, compacto, de elevada velocidad de puesta en funcionamiento y parada, no contaminante del medio ambiente, y con ausencia de peligros tanto para los manipuladores, como para los posteriores usuarios.

### Introducción

La Fusariosis del melón, causada por el hongo patógeno *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *melonis* Sneider and Hansen, es una de las más destructivas enfermedades que se presentan en todas las regiones productoras de este cultivo y, cuando aparece, es capaz de reducir la producción incluso por encima del 90 % (4,7,9,11, 14).

En Castilla-La Mancha, que representa una de las mayores áreas del mundo de cultivo de melón al aire libre, la ma-

dichas bandejas tienen dimensiones de 70 x 46 x 7.5 cm y tienen 216 alvéolos de 12 cm<sup>3</sup> de capacidad cada uno. En ellas los viveristas colocan para su enraizamiento, una a una, las semillas de melón, en un sustrato artificial a base de mezcla de turba negra y turba rubia (70:30;v:v). Para evitar la evaporación y favorecer la nascencia, una vez sembrada cada semilla en su alvéolo correspondiente, es usual cubrir el sustrato con una delgada capa de vermiculita.

Aunque la forma normal de combatir

---

### La fusariosis del melón es una de las más destructivas enfermedades que se presentan en todas las regiones productoras de este cultivo

---

yoría de los agricultores, debido al elevado precio de la semilla, práctica el cultivo del melón usando como técnica de implantación el trasplante de plántulas enraizadas en cámaras de ambiente controlado por viveristas especializados, utilizando para ello bandejas de poliuretano expandido. Normalmente,

esta enfermedad es la prevención del patógeno en el terreno (17), la reutilización de dichas bandejas que contienen restos de sustrato infestado, es una de las principales causas responsables del rápido desarrollo de esta enfermedad. Así ocurre también en patógenos similares (1).

\*E.U.I.T.A. Universidad Castilla-La Mancha

La lucha contra esta enfermedad en cultivares no resistentes implica la utilización de semillas y de plántulas exentas del patógeno, lo que exige el uso de semilla sana y la erradicación del patógeno del sustrato y de la bandeja de propagación (5).

Los métodos químicos, como la aplicación de hipoclorito sódico o de formol, producen serios problemas de fitotoxicidad en las jóvenes plantas, así como riesgos para el manipulador y para los posteriores usuarios. Los métodos físicos, como el calentamiento convencional, además de ser voluminosos, difíciles de manejar y de poder contaminar el medio ambiente (12), no son aplicables a las bandejas de propagación. La solarización, aunque permite reducir la viabilidad del patógeno, como requiere de seis a ocho semanas en la época estival, no es aplicable (17). Ha sido por todo ello por lo que, basándose en que estudios de laboratorio y ensayos de campo, han demostrado que la energía aplicada mediante ondas de ultra alta frecuencia (microondas) es destructiva para un amplio espectro de parásitos tanto del suelo, como de las semillas (3, 6, 10, 12, 15, 17), los autores de este trabajo, han utilizado las ondas de frecuencia de 2.45 GHz producidas por un horno microondas convencional, para eliminar las conidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* que provocan la Fusariosis del melón.

Esta técnica, que son muchos los autores que coinciden en que la mayor desventaja que tiene, cuando se aplica a la desinfestación, es que requiere gran cantidad de energía (2, 8, 11, 13, 16), los autores de este trabajo, basándose en que dichas afirmaciones están referidas a la desinfestación de grandes masas, y en que, en el caso de la propagación de semillas de melón, se utilizan materiales transparentes a las microondas y pequeñas cantidades de suelo, han demostrado que, con un bajo consumo energético, las microondas son capaces de eliminar las conidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* en pocos segundos.

Para demostrarlo han realizado ensayos con un microondas comercial, estu-



diando, en primer lugar, la cantidad de energía a aplicar al inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* suspendido en agua esterilizada para su total erradicación y, en segundo lugar, han estudiado la Curva de Progreso de la Enfermedad, bañando por inmersión, con lo que se asegura el ataque del patógeno, las raíces de plántulas de melón de la variedad Amarillo Canario, propagadas con una asepsia total, tanto en una solución testigo con una concentración de conidias de  $5 \cdot 10^6$  conidias/ml, como en la misma solución, pero irradiada con la cantidad de energía suficiente como para erradicar totalmente el hongo.

Los resultados obtenidos con el trabajo permiten concluir que, si se aplica suficiente cantidad de energía al inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, usando microondas de 2,45 GHz de frecuencia, se puede conseguir la erradicación total de dicho patógeno, con un bajo consumo energético. Dicha técnica, constituye un proceso inocuo, no destructivo y que no tiene ningún efecto negativo, que ofrece además, entre sus más importantes ventajas, su rápida transferencia de energía, su capacidad selectiva de calentamiento, lo compacto de los equipos, su elevada velocidad de puesta en funcionamiento y parada, la no contaminación medioambiental y la ausencia de peligros tanto para los manipuladores, como para los posteriores usuarios.

## Materiales y métodos

Todos los ensayos se realizaron con un horno microondas convencional (DAE-WOO KOC-970T) de 1400 vatios de potencia nominal y 1000 vatios de potencia de salida, que trabaja a 2.45 GHz y produce las microondas mediante un magnetrón alimentado por un transformador de 220 voltios de entrada y 4000 voltios de salida. El magnetrón envía las ondas al interior de un receptáculo en forma de paralelepípedo de 34 x 24 x 33 cm de longitud, construido en acero inoxidable, cerrado con una puerta con aislante de doble capa de vidrio y filtro. Las ondas son enviadas al interior del receptáculo mediante una campana conductora colocada en una de sus caras laterales. Dicho horno está provisto de un sistema digital de control que permite aplicar la irradiación producida por el magnetrón con intervalos de un segundo.

El sustrato en el que se llevaron a cabo los experimentos fue una mezcla de turba negra y turba rubia (70:30;v:v).

Las semillas de melón utilizadas en los ensayos fueron del cv. Amarillo Canario, variedad escogida por ser susceptible a todas las razas del patógeno estudiado (19).

El patógeno utilizado fue un aislado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* raza 2, que había sido aislado de plantas enfermas procedentes de fincas colaboradoras de cultivadores de melón de la provincia de Ciudad Real (España).



Del borde de la colonia de cultivos monospóricos del patógeno de seis días, se extrajeron discos de micelio de 5 mm de diámetro, cinco de los cuales fueron introducidos en matraces Erlenmeyer que contenía 100 mililitros de caldo patata-dextrosa (CPD), los cuales fueron incubados en un agitador orbital, a 120 r.p.m., a  $25 \pm 2$  °C de temperatura y 16 horas/día de luz fluorescente ( $450 \mu\text{mol E. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). A los seis días, el contenido de los matraces se filtró a través de ocho capas de gasa estéril, ajustándose la suspensión de microconidias a una concentración de  $5 \cdot 10^6$  conidias/ml.

Para determinar la cantidad de energía que era necesario aplicar para eliminar las conidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, la primera parte del ensayo consistió en introducir en el microondas el inóculo suspendido en agua esterilizada desionizada. Diez mililitros de suspensiones de  $5 \cdot 10^6$  conidias/ml fueron añadidos respectivamente a tubos de ensayo esterilizados, de  $20 \text{ cm}^3$  de capacidad. Colocándolos, en grupos de seis, en el centro del horno, fueron sometidos a irradiaciones de tiempo crecientes en progresión aritmética de razón tres segundos. La viabilidad del inóculo después de cada irradiación se determinó por el método de dilución en placas de Petri, en medio de cultivo JV8 semiselectivo para *Fusarium*. La viabilidad fue comparada con la del inóculo no irradiado y mantenido en los tubos de

ensayo a  $25 \pm 2$  °C. El ensayo fue repetido dos veces.

Una vez determinada la cantidad de energía a aplicar para erradicar las conidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, se estudió la patogenicidad de las conidias tras el tratamiento con el microondas. Para ello se propagaron, en condiciones de asepsia total, semillas de la variedad Amarillo Canario, susceptible a todas las razas de dicho patógeno. Las semillas de melón fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas dos minutos en hipoclorito sódico al 10%. A continuación se pusieron

a germinar en placas Petri que contenían vermiculita estéril. Éstas se colocaron en cámara de crecimiento a  $25 \pm 2$  °C, 75 % de humedad relativa y 16 horas/día de fotoperiodo con luz fluorescente ( $450 \mu\text{mol E. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las semillas que habían germinado se trasplantaron una a una a los alvéolos de 12 trozos de bandeja de 10 alvéolos cada uno, cortados de bandejas comerciales que nunca habían sido utilizadas. Los alvéolos se llenaron con mezcla previamente esterilizada de turba negra y turba rubia (70:30; v:v). Una vez sembradas se cubrieron con una ligera capa de vermiculita estéril para reducir la evaporación y favorecer la nascencia y se mantuvieron, regándolas cada dos días, a capacidad de campo, en la cámara de crecimiento a  $25 \pm 2$  °C, con 16 horas/día de fotoperiodo con luz fluorescente ( $450 \mu\text{mol E. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Transcurridos siete días, las plántulas de melón en las que habían emergido las primeras hojas verdaderas, se sacaron cuidadosamente de los alvéolos y se lavaron sus raíces con agua corriente, eliminando todos los restos de sustrato. Las plantas de cuatro bloques de 10 plántulas/bloque fueron inoculadas sumergiendo sus raíces en una suspensión de 60 ml de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* con concentración de  $5 \cdot 10^6$

conidias/ml, la cual había sido irradiada cada una con una energía de 24.000 julios (24 segundos de irradiación), dicha cantidad de energía había sido determinada en la primera fase del ensayo, como la cantidad de energía a aplicar para la erradicación del patógeno de los 10 ml inóculo suspendido en agua esterilizada contenidos en cada uno de los seis tubos de ensayo irradiados, que contenían un total de 60 ml de suspensión de inóculo. Las plantas de los cuatro bloques de 10 plantas/bloque inoculadas fueron trasplantadas individualmente, separando los bloques en bandejas, a contenedores de plástico de  $250 \text{ cm}^3$  de capacidad, rellenos de la misma mezcla de sustrato artificial esterilizado. Como testigo fueron utilizados cuatro bloques de plan-

**Tabla 1.** Efecto de la aplicación con microondas de energía de 3000, 6000, 9000, 12000, 15000, 18000, 21000 y 24000 Julios a los tubos de ensayo conteniendo una suspensión conídica de *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*

Energía aplicada (Julios)	Número de U.F.C. X $10^4 / \text{cm}^3$ de suspensión de inóculo
0	246.7 a
3000	218.3 ab
6000	178.3 abc
9000	161.7 bcd
12000	147.3 cde
15000	145.0 de
18000	103.3 e
21000	65.7 f
24000	0 g

1) Las diferentes energías irradiadas se aplican con regulando el temporizador con intervalos de un segundo, del cual dispone el horno microondas utilizado en los ensayos.

2) Las Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.) fueron determinadas por el método de las diluciones en Agar JVB 78.

3) El inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* utilizado eran suspensiones de conidias a la concentración de  $5 \cdot 10^6$  conidias/ml.

4) Cada valor presentado en la tabla es la media de las Unidades Formadoras de Colonias que aparecieron después de irradiar los tubos con cada una de las energías utilizadas en los ensayos.

5) Valores en columnas seguidos de letras diferentes indican diferencias significativas al nivel 95 % ( $p < 0.05$ ).

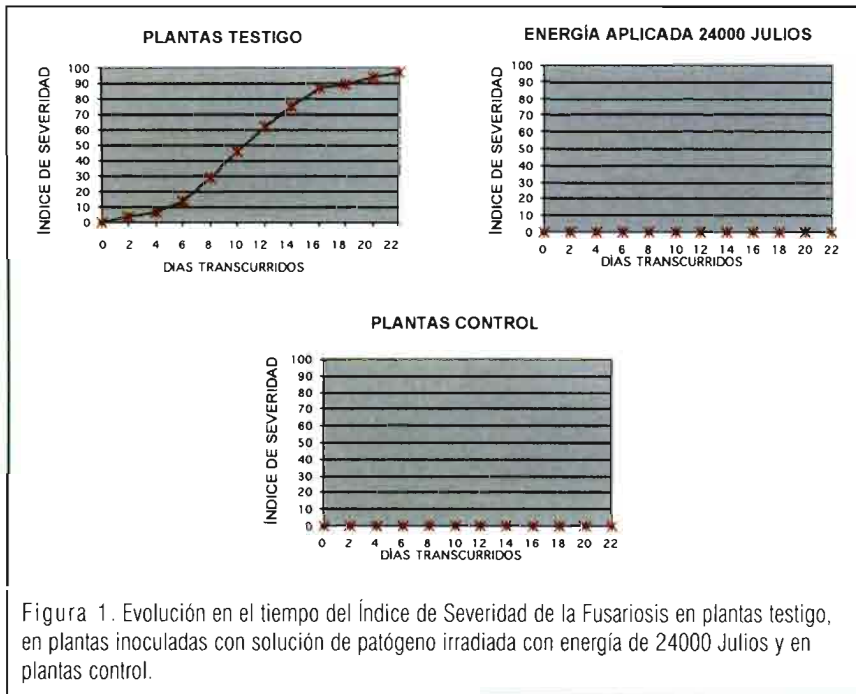


Figura 1. Evolución en el tiempo del Índice de Severidad de la Fusariosis en plantas testigo, en plantas inoculadas con solución de patógeno irradiada con energía de 24000 Julios y en plantas control.

tas/bloque, cuyas raíces se sumergieron en 60 cm<sup>3</sup> de suspensión de inóculo con una concentración de 5.10<sup>6</sup> conidias/ml. Como control sin inocular se utilizaron cuatro bloques de 10 plantas/bloque, cuyas raíces se bañaron en agua esterilizada. Tanto las plantas testigo, como las plantas control, se trasplantaron a sus respectivos contenedores, rellenos del mismo sustrato esterilizado, de idéntica forma que a los anteriores. Todos los bloques de plantas fueron mantenidos, para evitar contaminaciones, en bandejas independientes, en una cámara de crecimiento durante 22 días, a 25±2 °C, con 16 horas de fotoperiodo con luz fluorescente (450 μmol E. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) donde se regaban cada dos días a capacidad de campo. Durante los 22 días que se mantuvieron las plantas en la referida cámara de crecimiento, cada dos días, las plantas fueron observadas, cuantificando el número de plantas de cada bloque afectadas de Fusariosis, así como la severidad del ataque, según la siguiente escala de valores: 0 para las plantas sanas, una para las plantas que presentaban síntomas leves, dos para las que presentaban síntomas severos y cuatro para las plantas muertas. Con los valores obtenidos se calculó el denomi-

nado Índice de Severidad de la Enfermedad, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de severidad de la enfermedad (\%)} = \frac{\sum n_i \cdot s_i}{4 \cdot N} \cdot 100$$

Siendo:

*n<sub>i</sub>*: número de plantas afectadas por cada grado de severidad.

*s<sub>i</sub>*: grado de severidad del ataque (0-4).

*N*: número total de plantas usadas para cada energía aplicada.

Para comparar la severidad de la enfermedad que apareció en los tres grupos de plantas se representaron en unos ejes cartesianos las Curvas de Progreso de la Enfermedad. Para ello se colocaron en abscisas los días transcurridos tras la inoculación, y en ordenadas los Índices de Severidad de la Enfermedad, calculados según la fórmula precedente y, a continuación, se calcularon las Superficies

Tabla 2. Superficie Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad

Bloque	Superficie bajo la curva de progreso de la enfermedad
Plantas testigo	1111,8
24000 julios	0
Plantas control	0

La superficie bajo la curva de Progreso de la enfermedad permite tener una idea clara de la severidad de la enfermedad, ya que representa la suma de los productos (en las medias de los índices de Severidad calculados y del número de días transcurridos entre las dos lecturas de dichos índices de Severidad).

Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad, mediante el sumatorio del producto de la media del grado de severidad entre dos observaciones consecutivas, por el número de días transcurridos entre dichas observaciones.

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa estadístico Statgraphics version 3.5, utilizando el test ANOVA, seguido de un Test de Rango Múltiple.

## Resultados

La tabla 1 representa el efecto de la irradiación de los tubos de ensayo con las diferentes cantidades de energía aplicada con microondas en la viabilidad del inóculo de *Fusarium oxysporum* f.sp. melonis.

En la figura 1 se presenta el efecto de la aplicación de energía con microondas en la evolución en el tiempo del Índice de Severidad de la Fusariosis del melón. En los diagramas, en abscisas se representan, de dos en dos días, los 22 días siguientes a la inoculación de las raíces de las plántulas con conidias del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. melonis contenido en las soluciones del patógeno irradiadas con las diferentes cantidades de energía previstas en el ensayo y, en ordenadas, los correspondientes valores del Índice de Severidad de la Enfermedad expresados en porcentaje, calculados con la fórmula presentada previamente.

En la tabla 2 se presenta, transcurridos 22 días después de la inoculación, los valores medios de la Superficie Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad correspondientes a las plantas testigo, a las plantas inoculadas sumergiendo sus raíces en 60 ml de solución de inóculo con 5.10<sup>6</sup> conidias/ml a la cual se le había aplicado mediante irradiación con microondas de 2.4 Ghz de frecuencia la cantidad de energía de 24.000 julios (24 segundos de irradiación) y a las plantas control.

## Discusión

De la tabla 1 se deduce que, a medida que aumenta la energía aplicada con el microondas, disminuye el Número de Unidades For-

madoras de Colonias, y que, cuando la energía irradiada fue  $\geq 24.000$  julios, el número de Unidades Formadoras de Colonias obtenido es nulo.

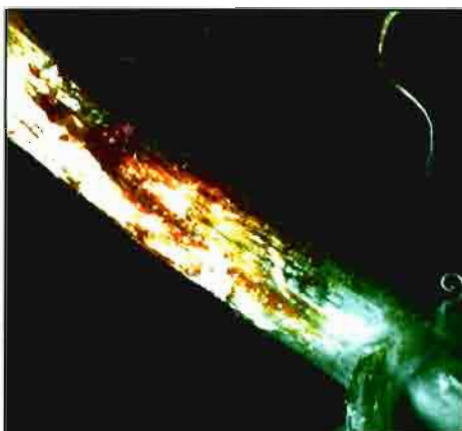
Estos resultados permiten considerar, de acuerdo con Mavrogianopoulos et al.(2000) y otros autores que la irradiación con microondas constituye una idea muy atractiva para la eliminación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Además abre una nueva ruta de desinfección que puede permitir a los viveristas eliminar uno de los más graves problemas que se les presenta cuando producen comercialmente plántulas de melón a partir de semillas.

De los ensayos para la obtención de la Curva de Progreso de la Enfermedad, es importante destacar que, en ningún caso, aparecieron diferencias significativas al nivel 95% entre los cuatro bloques de 10 plantas/bloque de cada grupo ensayado, lo cual indica, de forma muy clara, que el tratamiento con microondas es una técnica de gran uniformidad en cuanto a la eficacia de su aplicación.

También ocurrió que, ni en las plantas control, ni en las plantas que se inocularon con suspensiones de  $5.10^6$  conidias/ml a las que se le había aplicado una energía de 24.000 Julios, aparecieron síntomas de la enfermedad. Esto indica, en primer lugar, que en los ensayos realizados no aparecieron contaminaciones indeseables, y, en segundo lugar, lo cual es mucho más importante, que la irradiación con microondas del inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, permite, si la energía aplicada es suficiente, su total eliminación.

Es importante notar que, para la eliminación total de la infección que produce el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, la cantidad necesaria de energía es reducida. Esto indica, contrariamente a lo que ha sido expresado por otros autores cuando han utilizado la energía de las microondas para desinfección de suelos (R.P. Rice, A.R.Putham, 1977; R. Lal, W.B. Reed, 1988; S.O. Nelson, 1996), que, en este caso específico, no es necesaria una gran cantidad de energía para alcanzar resultados plenamente satisfactorios.

En conclusión, la irradiación con microondas de 2.45 GHz de frecuencia es un



método rápido, eficiente, seguro, cómodo, no destructivo, no contaminante, libre de residuos, y que no produce riesgos ni para el operario que lo aplica, ni para posteriores usuarios de las plántulas producidas, que se puede considerar como una técnica capaz de combatir la Fusariosis del melón.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha la subvención que les ha concedido para la ejecución de este trabajo.

## Bibliografía

1. Awuah R.T.; Lorbeer, J.W.; 1991.- Methyl bromide and steam treatment of an organic soil for control of *Fusarium* yellows of celery. *Plant disease* 75: 123-125.
2. Bhaskara Reddy, M.V.; Raghavan, G.V.S.; Kushalappa, A.C.; Paulitz, T.C. (3); 1998; Effect of microwave treatment on quality of wheat seeds infected with *Fusarium graminearum*; *Journal of Agricultural Engineering Res.* 71, 113-117.
3. Calvacante, M.J.B.; Muchovej, J.J.; (4); 1993; Microwave irradiation of seeds and selected fungal spores; *Seed Sci. & Technol.*, 21, 247-253.
4. Champaco, E.R.; Martyn, R.D.; Miller, M.E.; 1993.- Comparison of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* as causal agents of fruit rot and root rot of muskmelon. *HortScience* 28: 1174-1177.
5. Evcil; F.; Yalcin, O; 1977.- Preliminary studies on fungi causing melon wilt in the Aegean region. *Zirai Mucadele Arastinms Yilligi* 78.

6. Ferriss, R.S; (6)1984; Effects of microwave oven treatment on microorganisms in soil; *The American Phytothological Society*;74, 121126.
7. González, R.; Jiménez, R.M.; Gómez, J.; 1988.- Incidencia y distribución de las Fusariosis vasculares del melón y de la sandía en Andalucía. *Investigación Agraria: Serie Producción Vegetal* 3 (3): 377-392.
8. Lal, R; Reed,W.B.; 1988; The effect of microwave energy on germination and dormancy of wild oat seeds; *Canadian Agricultural Engineering* 22(1), 85-88.
9. Leach, J.G.; Currence, T.M. 1938; *Fusarium* wilt of muskmelon in Minnesota. *Minn. Agric. Exp. Stn. Tech. Bull.* 129.
10. Lozano, J.C.; Laberry,R; Bermúdez, A; (5)1986; Microwave treatment to eradicate seed-borne pathogens in Cassava True Seed, *L. Phytopathology* 117, 1-8.
11. Martyn, R.D.; Amador, J.; 1987.- *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* Race 0) of muskmelon in Texas. *Plant disease* 71: 469.
12. Mavrogianopoulos, A; Frangoudakis, J; Pandelakis, J; (2) 2000; Energy efficient soil disinfection by microwaves; *Journal of Agricultural Engineering Research*, Vol.75 (2000)149-153.
13. Nelson, S.O.; 1996; A review and assessment of microwave energy for soil treatment to control pest; *Transactions of de ASAE* 39(1),281.289.
14. Palohdi, R.R.; Sen, B.; 1981.- *Fusarium* wilt endangers riverbed cultivation of cucurbits. *Indian J. Mycol. Res.* 19: 51-56.
15. Reddy, P.; Mycock, D.J; Berjak, P; 1999.- (1) The effect of microwave irradiation on the ultrastructure and internal fungi of soybean seed tissues; *Seed Sci & Technol.* 28, 277-289.
16. Rice, R.P.; Putham, A.R.; 1977; Factors which influence the toxicity of UHF energy to weed seeds; *Weed Science*, 25(2),179-183.
17. Soriano, M.L.; Porras, A.; Pérez, C.; Fernández-Aparicio, M. 1998.- Tratamiento térmico de *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Phytoma* 99: 28-32.
18. Soriano, M.L.; Porras-Soriano, A.; Porras-Piedra, A.; Effects of microwave treatment on pathogenicity of "*Fusarium oxysporum* f.s.p. *melonis*"; XI Congress of the Mediterranean Phytopatological Union; Evora (Portugal); 17-20 de Septiembre de 2001.
19. Zinder, W.C.; Hansen, H.N.; 1940.- Species concept in *Fusarium*. *Am.J.Bot.*27: 64-67.