

Estudio de patogenicidad a melón de hongos del suelo causantes de colapso

R. BELTRÁN, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ

El síndrome del “colapso” en los cultivos de melón y sandía puede venir asociado a la presencia en las raíces de las plantas afectadas de distintos hongos del suelo, como *Monosporascus cannonballus*, *Acremonium cucurbitacearum*, *Rhizopycnis vagum* y *Plectosporium tabacinum*. En este trabajo se ha estudiado el comportamiento del melón frente a inoculaciones en suelo esterilizado y no esterilizado. Los resultados obtenidos en el peso fresco de la parte aérea indican que éste no es un parámetro adecuado para evaluar la patogenicidad de estos hongos. El índice de daños en raíces se presenta como un parámetro más fiable y, dentro de él, las combinaciones con *M. cannonballus* y/o *A. cucurbitacearum* presentaron daños más severos que las inoculaciones de *R. vagum* y/o *P. tabacinum*.

R. BELTRÁN, J. ARMENGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n, 46022-Valencia.

Palabras clave: *Acremonium cucurbitacearum*, *Cucumis melo*, *Monosporascus cannonballus*, *Rhizopycnis vagum*, *Plectosporium tabacinum*.

INTRODUCCIÓN

El síndrome del “colapso” es uno de los principales problemas fitosanitarios que afectan a los cultivos de melón (*Cucumis melo* L.) y sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai) a nivel mundial (MARTYN y MILLER, 1996; COHEN *et al.*, 2000). Esta afección está causada por múltiples agentes patógenos entre los que se incluyen hongos, bacterias y virus (BRUTON, 1998).

Uno de los más importantes es el hongo ascomiceto del suelo *Monosporascus cannonballus* Pollack *et Uecker*, que fue citado por primera vez en España afectando a melón en el año 1989 (LOBO-RUANO, 1990), siendo actualmente uno de los principales factores limitantes del cultivo de cucurbitáceas en algunas de las zonas productoras de nuestro país (BELTRÁN *et al.*, 2005). Otros

hongos del suelo asociados a este síndrome son *Acremonium cucurbitacearum* Alfaro-García, W. Gams *et J. García-Jiménez*, *Rhizopycnis vagum* D. F. Farr y *Plectosporium tabacinum* (van Beyma) M. E. Palm, W. Gams *et Nirenberg* (ALFARO-GARCÍA *et al.*, 1996; GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 2000; ARMENGOL *et al.*, 2003).

Uno de los síntomas del ataque de *M. cannonballus* es la presencia de necrosis y podredumbres en la raíz principal y raíces secundarias (MARTYN y MILLER, 1996). El ataque de *A. cucurbitacearum* se caracteriza por la destrucción de raicillas absorbentes y la presencia de acorchamientos en la raíz principal y secundarias (ALFARO-GARCÍA *et al.*, 1996). Estos daños reducen la capacidad de absorción de agua por parte de la planta, produciéndose un desequilibrio hídrico que provoca en pocos días la marchitez completa

de la parte aérea (MERTELY *et al.*, 1991). *R. vagum* y *P. tabacinum* han sido descritos como hongos secundarios que, con su ataque a las raíces afectadas por los hongos anteriores, contribuyen al deterioro del sistema radical de la planta (PÉREZ-PIQUERES, 2002; ARMENGOL *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, se han efectuado ensayos de patogenicidad con estas cuatro especies fúngicas en diversos hospedantes. En los primeros años de la aparición de los problemas de "colapso", MERTELY *et al.* (1993) comprobaron la patogenicidad de *M. cannonballus* a diversas especies de cucurbitáceas. ALFARO *et al.* (1996) estudiaron la patogenicidad de *A. cucurbitacearum* a melón, y posteriormente, ARMENGOL *et al.* (1998) y BRUTON *et al.* (2000b) realizaron ensayos de patogenicidad con este hongo en varias especies de cucurbitáceas, otros cultivos y malas hierbas, completando así la información sobre su rango de hospedantes. Más adelante se realizaron ensayos de patogenicidad a melón que sirvieron para comprobar la implicación en el síndrome del "colapso" de *R. vagum* (ARMENGOL *et al.*, 2000; 2003) y de *P. tabacinum* (PÉREZ-PIQUERES, 2002). Recientemente, ANDRADE *et al.* (2005) efectuaron ensayos de patogenicidad a melón de *M. cannonballus* evaluando diversos parámetros y estudiando la correlación entre ellos.

Por otro lado, BRUTON *et al.* (2000a) estudiaron la patogenicidad a melón de *M. cannonballus* y *A. cucurbitacearum*, comparando ambos hongos, pero siendo inoculados también por separado. BIERNACKI y BRUTON (2001) efectuaron un ensayo similar al anterior, añadiendo a *R. vagum* entre los hongos ensayados. En otros estudios, se comparó la patogenicidad de *A. cucurbitacearum*, *M. cannonballus* y *R. vagum*, junto a otros hongos que también provocan podredumbres en las raíces de cucurbitáceas, tales como *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani* y *Pythium* spp. (AEGERTER *et al.*, 2000).

Todos estos estudios tienen en común que fueron realizados inoculando cada una de estas especies individualmente. Hasta la

fecha no se ha realizado ningún estudio que analice el efecto de inoculación conjunta de estas especies, lo que se aproximaría más a la situación que se da en ambientes naturales, donde lo común es que se presenten a la vez varios de estos hongos.

El objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento del melón frente a inoculaciones con los hongos del suelo implicados en el síndrome del "colapso" en sus distintas combinaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislados fúngicos utilizados

Los ensayos se realizaron utilizando los aislados fúngicos mostrados en el Cuadro 1, en el que se indica su procedencia y el cultivo del cual fueron obtenidos.

La conservación de estos aislados se efectuó en tubos con turba autoclavada almacenada a temperatura ambiente y para la realización de los ensayos se hicieron crecer en placas Petri con medio Patata Dextrosa Agar (PDA) durante 15 días a una temperatura de 26°C en ciclos alternantes de oscuridad y 12 horas de luz día + ultravioleta cercano (Sylvania F-40 BLB).

Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo, se mezclaron 1000 ml de arena lavada (0,5 mm de diámetro) y 91,5 g de salvado de avena, poniendo 500 ml de esta mezcla en frascos de cristal de 1 litro. Se añadieron 75 ml de agua destilada a cada recipiente, se agitaron y se esterilizaron al autoclave tres veces a 120°C durante 1 hora, con una separación entre cada autoclavado de 24 horas como mínimo.

Cada uno de los frascos de cristal fue inoculado con dos fragmentos de PDA en los que había crecido el hongo a inocular, incubándose a 25°C hasta que la mezcla colonizada tenía unos 5 cm de diámetro. En este momento, se agitó el recipiente con el fin de distribuir uniformemente el hongo por toda la mezcla, y se abrió en cámara de flujo para favorecer la aireación y el crecimiento del

Cuadro 1. Origen de los aislados.

Especie	Aislado	Localidad	Provincia	Hospedante
<i>M. cannonballus</i>	M1	Xilxes	Castellón	Calabaza
<i>A. cucurbitacearum</i>	A419	Llanos del Caudillo	Ciudad Real	Melón
<i>R. vagum</i>	R25	Argamasilla de Alba	Ciudad Real	Melón
<i>P. tabacinum</i>	P467	Ciudad Real	Ciudad Real	Melón

hongo. Posteriormente, la incubación de los frascos se prolongó a 25°C durante otros 21 a 28 días.

El conteo de los propágulos presentes en la mezcla de arena y salvado de avena se realizó mediante el método de las diluciones sucesivas, utilizando una solución al 1% de hidroxietil celulosa (HEC) como diluyente y placas Petri con medio PDA + 500 ppm de estreptomycin (PDAS). Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de inóculo (DHINGRA y SINCLAIR, 1995).

Sustrato

Se escogió como sustrato de crecimiento de las plantas un suelo natural procedente de Calasparra (Murcia), de una parcela en la que nunca se había cultivado melón, ni se ha detectado la presencia de "colapso" en la comarca. Este suelo se empleó sin autoclavar y esterilizado al autoclave, tres veces a 120°C durante una hora en días sucesivos.

Preparación e inoculación de macetas

Para la inoculación se utilizaron macetas de 16 cm de diámetro y 1,5 litros de capacidad. A cada una de ellas se les añadió el sustrato y el inóculo adecuado para conseguir los siguientes niveles indicados en otros estudios de patogenicidad: 20 UFC/g de suelo para *M. cannonballus* (BRUTON, 1995), 50.000 UFC/g de suelo para *A. cucurbitacearum* (ARMENGOL *et al.*, 1998), 1.000 UFC/g de suelo para *R. vagum* (MILLER *et al.*, 1996; ARMENGOL *et al.*, 2000) y 150.000 UFC/g de suelo para *P. tabacinum* (PÉREZ-PIQUERES, 2002).

Se realizaron cinco repeticiones (macetas) para cada una de las tesis consideradas (16 combinaciones de hongos, incluyendo el

control no inoculado), y todas éstas para los dos tipos de suelo empleados, resultando un total de 160 macetas. Las combinaciones fueron las siguientes:

- Control sin inocular: C.
- Combinaciones primarias: Ac, Mc, Rv, Pt.
- Combinaciones secundarias: Ac+Mc, Ac+Rv, Ac+Pt, Mc+Rv, Mc+Pt, Rv+Pt.
- Combinaciones terciarias: Ac+Mc+Rv, Ac+Mc+Pt, Ac+Rv+Pt, Mc+Rv+Pt.

- Combinación cuaternaria: Ac+Mc+Rv+Pt.
(Siendo: C = control sin inocular; Ac = *A. cucurbitacearum*; Mc = *M. cannonballus*; Rv = *R. vagum* y Pt = *P. tabacinum*)

Este estudio se efectuó en dos años consecutivos (2002 y 2003). El tipo de suelo y las combinaciones consideradas fueron las mismas durante los dos años; la única excepción fue la combinación Rv+Pt, que solamente se realizó en el año 2003, para los dos suelos. La variedad de melón empleada en este ensayo fue Temprano Rochet. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente con una solución de hipoclorito sódico (1,5% de cloro activo durante 1 minuto) y, posteriormente, se sembraron cinco de ellas por maceta. Las macetas se llevaron a un invernadero controlado con unas condiciones ambientales de 25-30°C. Tras la germinación, se dejó una planta por maceta.

Parámetros evaluados

A los 45 días se extrajeron las plantas cuidadosamente, lavando las raíces, y evaluando los siguientes parámetros: peso fresco de la parte aérea, índice de daños en raíces (IDR) y la frecuencia de aislamiento de hongos en raíces.

Para la medición del peso fresco de la parte aérea y con el fin de estandarizar el

método, se realizó un corte en la planta al nivel de los cotiledones. En la evaluación de daños en raíces se utilizó la escala de valores siguiente (Bruton, comunicación personal):

0: El hipocotilo, la raíz primaria y las raíces secundarias no muestran ningún tipo de síntomas de la afeción

1: El hipocotilo, la raíz primaria y las raíces secundarias comienzan a mostrar un ligero pardeamiento

2: El hipocotilo presenta un pardeamiento moderado y comienza a notarse una reducción del córtex alrededor del cilindro vascular. En la raíz primaria empieza a observarse un pardeamiento moderado, y se ven algunas pequeñas lesiones. Las raíces secundarias también presentan un pardeamiento moderado y empieza a notarse una reducción de barbada.

3: El hipocotilo presenta un pardeamiento severo y empiezan a estar expuestos los haces vasculares. En la raíz primaria se observa un pardeamiento severo y lesiones abundantes. Las raíces secundarias también presentan un pardeamiento severo y la reducción de barbada es del 25-50%.

4: El hipocotilo se encuentra muy dañado, en algunos casos con consistencia blanda; el córtex suele estar completamente ausente y los haces vasculares completamente expuestos. La raíz primaria está muy dañada y se ven áreas necróticas. Las raíces secundarias están muy afectadas, con necrosis abundantes, la reducción de barbada es muy acentuada. Ocasionalmente la planta se marchita y muere.

El valor de IDR para cada una de las tesis es la media de los valores de las cinco plantas estudiadas.

Una vez efectuada la evaluación de daños, se tomaron pequeños trozos de raíz, hipocotilo y raíces secundarias, preferentemente de las zonas en que se veían lesiones o zonas sospechosas de estar afectadas por los hongos inoculados; estos fragmentos se sembraron en medio de cultivo PDAS. Se sembraron un total de 14 puntos de aislamiento por cada una de las plantas, distribuidos entre el hipocotilo, raíz principal y raíces secunda-

rias. Las placas sembradas se incubaron en estufa a 25-27° C durante 3-4 días, al cabo de los cuales se pasaron a medio PDA las distintas colonias fúngicas obtenidas. Para proceder a su identificación, estas placas se incubaron durante 15 días a 26° C en ciclos alternantes de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz día + ultravioleta cercano (Sylvania F-40 BLB), para inducir la esporulación.

Análisis estadístico

Los datos de peso fresco de la parte aérea y de daños en raíces fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), usando el test LSD ($P=0,05$) para realizar la comparación entre medias, realizándose un análisis multifactorial y de interacciones considerando como factores a cada uno de los hongos inoculados en el trabajo. Asimismo, se realizó una regresión lineal entre los parámetros "peso fresco de la parte aérea" e "índice de daños en raíces", para estudiar su relación. Todos estos análisis se efectuaron mediante el software Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Englewood Cliffs, NJ, USA).

RESULTADOS

Peso fresco de la parte aérea

Tras la comparación estadística de los datos de peso fresco y daños en raíces, se determinó que existían diferencias significativas entre los dos años de estudio, por lo que se procedió a su análisis tomando los datos de cada año por separado.

En el Cuadro 2 aparecen las medias de los valores de peso fresco de la parte aérea para los dos tipos de suelo durante los dos años de duración del estudio, así como el análisis estadístico de estos datos. Asimismo, en estos cuadros se representa la comparación estadística de los datos totales en ambos tipos de suelo para cada uno de los años de estudio.

En el ensayo de 2002, el menor valor de peso fresco de la parte aérea en el suelo autoclavado lo presentó la combinación cuater-

Cuadro 2. Media de peso fresco de la parte aérea para cada tipo de suelo y año de estudio (Años 2002 y 2003).

Combinación ^x	Año 2002				Año 2003			
	Suelo autoclavado		Suelo no autoclavado		Suelo autoclavado		Suelo no autoclavado	
Control	11,81 ^y	b ^z	6,57	cde	30,29	a	26,06	a
Ac	16,46	a	9,21	abcde	18,77	c	17,52	bcde
Mc	3,33	def	9,27	abcde	4,52	d	22,33	ab
Rv	4,64	cdef	9,60	abcde	20,34	bc	16,53	bcde
Pt	11,25	ab	10,02	abcd	17,7	c	14,27	defg
Ac+Mc	2,23	ef	8,80	bcde	19,82	c	12,21	defg
Ac+Rv	8,62	bc	5,40	de	29,14	ab	18,94	abcd
Ac+Pt	11,81	b	11,64	ab	15,49	c	21,45	abc
Mc+Rv	9,67	cde	9,71	abcde	21,66	c	15,62	cdef
Mc+Pt	1,11	f	13,82	a	22,69	abc	11,34	efg
Rv+Pt	-	-	-	-	20,27	c	9,19	fg
Ac+Mc+Rv	3,94	def	8,53	bcde	-	-	22,65	bcde
Ac+Mc+Pt	2,60	def	11,62	abc	16,53	c	8,76	fg
Ac+Rv+Pt	6,19	cd	11,04	abc	18,25	c	13,76	defg
Mc+Rv+Pt	3,34	def	7,22	bcde	18,57	c	7,00	g
Ac+Mc+Rv+Pt	0,87	f	4,67	e	14,83	c	12,39	defg
Media	6,09	B	9,03	A	17,95	A	15,50	B

^xAc = *A. cucurbitacearum*; Mc = *M. cannonballus*; Rv = *R. vagum*; Pt = *P. tabacinum*

^yPeso fresco de la parte aérea en gramos (media de cinco plantas)

^zNúmeros en la columna seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P=0,05$). Las letras minúsculas corresponden a la comparación entre tratamientos. Las letras mayúsculas corresponden a la comparación entre tipos de suelo.

caria (Ac+Mc+Rv+Pt), con 0,87 g. Las siguientes tesis con menor peso fresco fueron Mc+Pt, Ac+Mc y Ac+Mc+Pt, con 1,11 g, 2,23 g y 2,60 g, respectivamente. En cambio, el mayor valor de peso fresco en la parte aérea correspondió a la tesis Ac, con 16,46 g. Se encontraron diferencias significativas entre los cuatro valores superiores y los menores valores de peso fresco en la parte aérea. Asimismo, también se encontraron diferencias significativas entre la tesis Mc y el control sin inocular.

En el suelo no autoclavado, el menor valor de peso fresco en la parte aérea también correspondió a la combinación cuaternaria (Ac+Mc+Rv+Pt), con 4,67 g. Por otro lado, los mayores valores de peso fresco se obtuvieron con las tesis Ac+Pt y Ac+Mc+Pt, con 11,64 g y 11,62 g, respectivamente. De igual forma, se observaron diferencias signi-

ficativas entre la combinación cuaternaria y las dos combinaciones de mayor valor de peso fresco.

En el año 2003, las plantas de la combinación Ac+Mc+Rv en el suelo autoclavado se secaron antes de la finalización del periodo de estudio, no pudiéndose determinar las causas de su muerte, de ahí que su peso fresco no fue considerado. En el suelo autoclavado, la combinación sólo con Mc fue la de menor peso fresco, con 4,52 g. En cambio, la combinación que obtuvo mayor peso fresco en la parte aérea fue el control sin inocular, con 30,29 g. Se hallaron diferencias significativas entre las tesis con mayor peso fresco (control sin inocular, Ac+Rv), y las de menor peso fresco en la parte aérea (Mc, Ac+Mc+Rv, Ac+Pt y Ac+Mc+Pt).

Para el suelo no autoclavado, la combinación con mayor peso fresco fue el control sin

Cuadro 3. Análisis de la varianza para el efecto de los diferentes hongos inoculados en el peso fresco de la parte aérea de las plantas, en los ensayos realizados durante los años 2002 y 2003, en suelo autoclavado y no autoclavado.

Factores	Año 2002		Año 2003	
	Suelo autoclavado	Suelo no autoclavado	Suelo autoclavado	Suelo no autoclavado
A: <i>A. cucurbitacearum</i>	0,7320 ^x	0,0643	0,2743	0,0831
M: <i>M. cannonballus</i>	0,0000	0,2403	0,0002	0,0139
R: <i>R. vagum</i>	0,0607	0,4950	0,0008	0,0000
P: <i>P. tabacinum</i>	0,3648	0,0058	0,0001	0,0033
Interacciones				
AxM	0,2970	0,8375	0,4437	0,2298
AxR	0,1429	0,0708	0,0022	0,1984
AxP	0,0864	0,5434	0,0002	0,0033
MxR	0,0002	0,0256	0,0009	0,8557
MxP	0,2892	0,0355	0,0063	0,1030
RxP	0,5801	0,3302	0,4143	0,4012
AxMxR	0,8699	0,0477	0,0777	0,1885
AxMxP	0,0207	0,7916	0,0001	0,3210
AxRxP	0,2079	0,7200	0,0075	0,0000
MxRxP	0,0545	0,0041	0,9603	0,6003
AxMxRxP	-	-	0,0000	0,8325

^xValor de *P* (<0,05) ó probabilidad ANOVA.

inocular con 26,06 g; en cambio, la tesis con menor peso fresco fue Mc+Rv+Pt con 7,00 g. Asimismo, se hallaron diferencias significativas entre el control sin inocular y las combinaciones de menor peso fresco.

Respecto a los datos medios de peso fresco en la parte aérea del total de plantas en cada suelo, en el año 2002, las plantas cultivadas en el suelo autoclavado obtuvieron un valor medio de 6,09 g, que difería significativamente de las cultivadas en el suelo no autoclavado, que llegaron a alcanzar una media de 9,03 g. Por el contrario, en el año 2003, la media de peso fresco en la parte aérea para el suelo autoclavado fue de 17,95 g, significativamente superior a la media de peso fresco en el suelo no autoclavado, que se quedó en 15,50 g.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados del análisis multifactorial para el parámetro del peso fresco, calculando el efecto de los hongos inoculados para cada tipo de suelo, durante los dos años de duración del estudio.

En el año 2002, para el suelo autoclavado

solamente fue significativo *M. cannonballus*, así como algunas de las interacciones en las que estaba presente este hongo, que fueron las que menor peso fresco obtuvieron. En ese mismo año, para el suelo no autoclavado, el único hongo que resultó significativo fue *P. tabacinum*, junto con algunas de las interacciones en las que estaba presente, pero en este caso por ser las que mayor peso fresco presentaron. En el año 2003, para el suelo autoclavado fueron considerados significativos *M. cannonballus*, *R. vagum* y *P. tabacinum*, al igual que algunas de las interacciones con estas especies, teniendo muchas de las combinaciones donde se encontraban estos hongos un peso fresco significativamente menor que el control. En ese mismo año, para el suelo no autoclavado, también fueron considerados significativos *M. cannonballus*, *R. vagum* y *P. tabacinum*, teniendo también la mayor parte de las combinaciones entre estos hongos un peso fresco significativamente menor que el control.

Evaluación de daños en raíces

Los resultados de la evaluación de daños en las raíces de las plantas inoculadas (IDR) se muestran en el Cuadro 4, para todas las combinaciones y suelos considerados, durante los dos años de estudio. En estos mismos cuadros se observan también los valores medios de IDR para el total de plantas cultivadas en cada suelo y año de estudio.

Respecto a los resultados del año 2002, en el suelo autoclavado, la combinación que obtuvo un IDR significativamente menor al de todas las demás fue el control sin inocular, con un valor de 0,92. En cambio, las combinaciones que dieron un mayor IDR fueron Ac+Mc+Rv+Pt, Ac+Mc+Rv, Ac+Mc y Mc+Pt, todas ellas con el máximo valor en la escala de daños (4). Se encontraron diferencias significativas entre estas combina-

ciones y las que obtuvieron menor IDR, comentadas anteriormente.

En el suelo no autoclavado, la combinación que obtuvo menor índice de daños en raíces también fue el control no inoculado, con un valor de IDR de 0,42. Por otra parte, la combinación con mayor IDR fue Mc+Rv+Pt, con un valor de 3,83. De la misma forma, se encontraron diferencias significativas entre todas estas combinaciones.

En el año 2003 y suelo autoclavado, la tesis que tuvo un menor valor de IDR fue el control sin inocular, con ausencia de daños en todas las raíces evaluadas. Por otro lado, la combinación con mayor IDR fue la de Ac, con un valor de IDR de 3,6. Se hallaron diferencias significativas entre las combinaciones que presentaron menor IDR y las que presentaron un mayor IDR.

Cuadro 4. Media de índice de daños en raíces (IDR) para cada tipo de suelo y año de estudio (Años 2002 y 2003).

Combinación ^x	Año 2002				Año 2003			
	Suelo autoclavado		Suelo no autoclavado		Suelo autoclavado		Suelo no autoclavado	
Control	0,92 ^y	a ^z	0,42	a	0	a	0	a
Ac	3,33	d	1,92	b	3,60	k	2,50	de
Mc	3,92	e	2,83	e	3,50	jk	2,50	de
Rv	2,17	b	2,33	c	2	c	1,50	b
Pt	2,33	b	2,5	cd	1,80	bc	1,90	c
Ac+Mc	4	e	3,17	fg	3,50	jk	3	fg
Ac+Rv	3,25	c	3	ef	2,90	ef	2,90	g
Ac+Pt	2,75	c	2,75	de	3,30	hij	2,50	de
Mc+Rv	3,83	e	2,5	d	2,80	de	2,30	d
Mc+Pt	4	e	3,17	fg	2,60	d	2,90	g
Rv+Pt	-	-	-	-	1,60	b	1,90	c
Ac+Mc+Rv	4	e	3,42	g	-	-	2,60	ef
Ac+Mc+Pt	3,83	e	2,75	de	3,20	ghi	2,90	g
Ac+Rv+Pt	3,5	d	3,42	g	3,40	ijk	2,90	g
Mc+Rv+Pt	3,25	d	3,83	h	3,10	fgh	2,70	efg
Ac+Mc+Rv+Pt	4	e	3,33	g	3	efg	2,80	fg
Media	3,27 ^d	A	2,76	B	2,77	A	2,36	B

^xAc = *A. cucurbitacearum*; Mc = *M. cannonballus*; Rv = *R. vagum*; Pt = *P. tabacinum*

^yÍndice de daños en raíces en una escala de 0 a 4 (media de cinco plantas)

^zNúmeros en la columna seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes según el test LSD ($P=0,05$). Las letras minúsculas corresponden a la comparación entre tratamientos. Las letras mayúsculas corresponden a la comparación entre tipos de suelo.

Cuadro 5. Análisis de la varianza para el efecto de los diferentes hongos inoculados en el índice de daños en raíces, en los ensayos realizados durante los años 2002 y 2003, en suelo autoclavado y no autoclavado.

Factores	Año 2002		Año 2003	
	Suelo autoclavado	Suelo no autoclavado	Suelo autoclavado	Suelo no autoclavado
A: <i>A. cucurbitacearum</i>	0,0000 ^x	0,0109	0,0000	0,0000
M: <i>M. cannonballus</i>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
R: <i>R. vagum</i>	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000
P: <i>P. tabacinum</i>	0,0009	0,0000	0,3811	0,0000
Interacciones				
AxM	0,0000	0,1495	0,0000	0,0000
AxR	0,1177	0,0021	0,0000	0,0947
AxP	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
MxR	0,0000	0,0000	0,0020	0,0000
MxP	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012
RxP	0,5280	0,0457	0,0105	0,0002
AxMxR	0,0000	0,0000	0,0000	0,0270
AxMxP	0,0000	0,0847	0,1503	0,0000
AxRxP	0,0023	0,0229	0,0021	0,0000
MxRxP	0,0137	0,0109	0,0000	0,0000
AxMxRxP	-	-	0,0000	0,0002

^xValor de P ($<0,05$) ó probabilidad ANOVA

Por otro lado, en el suelo no autoclavado, la inoculación con mayor IDR fue la de Ac+Mc con un valor de 3. La tesis que mostró un menor valor de IDR fue, al igual que en el suelo autoclavado, el control sin inocular, también con un IDR de 0 (ausencia de síntomas en raíces). Se encontraron diferencias significativas entre estas últimas tesis de menor IDR, y las tesis con mayor valor de índice de daños.

Por último, según los valores del índice de daños medio para el total de plantas de cada suelo, en el año 2002, el IDR medio de las plantas cultivadas en el suelo autoclavado fue de 3,27, mientras que las cultivadas en el suelo no autoclavado obtuvieron un IDR de 2,76. De igual forma, en el año 2003, el IDR medio calculado para las plantas del suelo autoclavado fue de 2,77, mientras que en el suelo no autoclavado, solo llegó a 2,36. En ambos años el valor de IDR fue superior en el caso del suelo autoclavado, encontrándose diferencias significativas para el valor de IDR entre ambos suelos considerados.

En el Cuadro 5 se muestran los resultados del análisis multifactorial para el índice de daños en raíces, calculando el efecto de los hongos inoculados para cada tipo de suelo durante los dos años de estudio.

Durante el año 2002 todos los hongos inoculados tuvieron un efecto significativo, al igual que la mayoría de sus interacciones, tanto para el suelo autoclavado como para el suelo no autoclavado. Sin embargo, hay que distinguir entre *M. cannonballus* y *A. cucurbitacearum*, cuyas inoculaciones individuales y conjuntas fueron las que presentaron mayores valores de IDR, y entre *R. vagum* y *P. tabacinum*, cuyas inoculaciones individuales y el conjunto de ambas obtuvieron menores valores de IDR, aunque superiores siempre respecto al control sin inocular. Este mismo resultado se dio en el año 2003, excepto con la inoculación de *P. tabacinum* en suelo autoclavado, que no resultó significativa.

En el estudio de regresión lineal efectuado entre los parámetros de peso fresco en la

parte aérea y el índice de daños en raíces (datos no mostrados), se obtuvieron índices de correlación inferiores al 35%, significativos en todos los casos durante los dos años de duración del estudio y para los dos suelos considerados.

Reaislamiento de hongos

Tanto en el año 2002 como en el 2003, todos los hongos inoculados en todas las combinaciones fueron posteriormente reaislamados. De esta manera se verificaron los postulados de Koch, demostrándose que las inoculaciones fueron correctas.

DISCUSIÓN

Esta es la primera vez que se realiza un ensayo de patogenicidad con los principales hongos causantes de "colapso" descritos en España, realizando inoculaciones conjuntas de todos ellos, en todas las combinaciones posibles.

Respecto al peso fresco de la parte aérea, en general se obtuvieron resultados contradictorios. En este sentido, el resultado obtenido para el control sin inocular en el suelo no autoclavado en el año 2002 fue precisamente uno de los valores más bajos (6,57 g). Asimismo, en el suelo autoclavado también del año 2002, el peso fresco de la parte aérea del control fue inferior al conseguido en algunas de las inoculaciones, como por ejemplo Ac.

Es destacable también que los valores de peso fresco en la parte aérea obtenidos para la tesis cuaternaria (Ac+Mc+Rv+Pt), fueron en algunos casos superiores a los de otras combinaciones de menor grado. Asimismo, tanto en el año 2002 como en el año 2003 y para los dos tipos de suelo, algunas combinaciones binarias e incluso terciarias no presentaron diferencias significativas con respecto al control sin inocular, mientras que algunas combinaciones de hongos en solitario sí las presentaron.

También destacan los diferentes resultados obtenidos entre los dos tipos de suelo en los dos años de duración del estudio. Así, en

el año 2002, al comparar los valores medios totales de peso fresco en la parte aérea, se observó que en el suelo no autoclavado el peso fresco medio en la parte aérea (9,03 g) era significativamente mayor que en el no autoclavado (6,09 g). En 2003 se dio el caso contrario, observándose diferencias significativas entre ambos suelos, con una media total de peso fresco en la parte aérea para el suelo autoclavado de 17,95g, superior a la del suelo no autoclavado que fue de 15,50g.

Los resultados obtenidos en el análisis multifactorial también denotan cierta contradicción entre los dos ensayos, puesto que en el año 2002 únicamente fueron significativas las inoculaciones con *M. cannonballus* en el suelo autoclavado (como el hongo que dio menor peso fresco) y *P. tabacinum* en el suelo no autoclavado (como el hongo que dio mayor peso fresco). Por otro lado, en el año 2003 fueron significativas las inoculaciones con *M. cannonballus*, *R. vagum* y *P. tabacinum*, así como la mayoría de las interacciones entre ellos, para los dos tipos de suelo, por tener valores bajos de peso fresco.

Por el contrario, en cuanto al índice de daños en raíces (IDR), se obtuvieron resultados similares para cada tipo de suelo en los dos años de duración del estudio. Así, en 2002, el IDR medio total para todas las combinaciones del suelo autoclavado fue significativamente mayor que para el suelo no autoclavado, con valores de 3,27 y 2,76, respectivamente. En el año 2003, también se presentaron diferencias significativas a favor del suelo autoclavado, comparado con el suelo no autoclavado, con valores medios totales de IDR de 2,77 y 2,36, respectivamente.

Resulta destacable la importancia que tuvieron las inoculaciones con *M. cannonballus*, por sí solo o en sus combinaciones con otros hongos. Así, en el año 2002 en el suelo autoclavado, las combinaciones que incluyeron a *M. cannonballus* presentaron valores elevados de IDR, oscilando entre 3 y 4, a diferencia de otras combinaciones que no presentaban este hongo, cuyo IDR fue inferior. En ese mismo año, para el suelo sin

autoclavar se obtuvieron valores similares de IDR, aunque ligeramente inferiores. En el año 2003, los valores de IDR fueron inferiores para los dos tipos de suelo, aunque también se observó que las combinaciones con *M. cannonballus* poseyeron mayor IDR. Del mismo modo, se obtuvieron valores elevados de IDR en las combinaciones con *A. cucurbitacearum*, excepto en algunos casos, como el suelo sin autoclavar del año 2002, en el que la inoculación únicamente con *A. cucurbitacearum* fue la que obtuvo el menor valor de IDR después del control sin inocular (1,92).

En cambio, respecto a *R. vagum* y *P. tabacinum*, se observa cómo en los dos tipos de suelos, y para los dos años de estudio, sus inoculaciones individuales y binaria fueron las que menor valor de IDR presentaron, con la salvedad del control. Se puede afirmar por tanto que, en general, las plantas que a priori mostraron menos daños en raíces fueron las que se inocularon únicamente con estos hongos, sin la presencia de *A. cucurbitacearum* y *M. cannonballus*. Además, el análisis multifactorial de los datos de IDR, reveló que todas las inoculaciones de todos los hongos, así como de la mayoría de sus interacciones fueron significativas, exceptuando a *P. tabacinum* en el suelo autoclavado, en el año 2003.

A la vista de estos resultados, se podría decir que el factor limitante en esta afección es la presencia en el suelo de *M. cannonballus* y *A. cucurbitacearum*, siendo menos importante la presencia de *R. vagum* y *P. tabacinum*. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en otros trabajos, en los que se cita a *M. cannonballus* y *A. cucurbitacearum* como los principales agentes fúngicos causante de “colapso” en cucurbitáceas (MERTELY *et al.*, 1991; GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 1994a y b; MARTYN y MILLER, 1996).

Los resultados obtenidos en la regresión entre los dos parámetros considerados, peso fresco de la parte aérea e IDR, mostraron una correlación muy baja entre ellos. Como ya se ha comentado respecto al análisis multifactorial efectuado para ambos parámetros, destaca que en el caso del índice de daños en

raíces, todas las especies fúngicas inoculadas fueron importantes en los dos años y los dos tipos de suelo, salvo *P. tabacinum* en el suelo autoclavado durante 2003. En cambio, para el peso fresco en la parte aérea, esto no fue así, puesto que en el año 2002 sólo resultaron significativos *M. cannonballus* y *P. tabacinum*, en el suelo autoclavado y sin autoclavar, con mayor y menor peso fresco, respectivamente, mientras que en 2003, *A. cucurbitacearum* no fue significativo en ningún tipo de suelo, a diferencia de los otros hongos inoculados. Así pues, no parece que exista una relación clara entre el peso fresco en la parte aérea y los daños causados por los hongos en las raíces. ANDRADE *et al.* (2005) tampoco encontraron una correlación significativa entre el peso fresco de la parte aérea y la severidad de síntomas de “colapso” en un ensayo de patogenicidad de *M. cannonballus* a melón llevado a cabo en Brasil.

Para poder explicar estos resultados, hay que hacer referencia a otros trabajos que relacionan este síndrome con la fructificación de la planta (PIVONIA *et al.*, 2002). El término “colapso” alude a la marchitez que tiene lugar en la planta en la época cercana a la maduración del fruto. En este momento, los frutos son un importante sumidero de agua para la planta; este hecho, unido al notable deterioro de la raíz tras la infección causada por los hongos del suelo, hace que en la planta se produzca un estrés hídrico que provoque la marchitez y muerte de la parte aérea de la planta en unos pocos días (BRUTON, 1998).

Se debe tener en cuenta que en este ensayo de inoculación de hongos del suelo en condiciones de invernadero, al cultivarse las plantas en macetas pequeñas, no es posible obtener la fructificación, con lo cual no se debe considerar al peso fresco en la parte aérea como un buen indicador de la enfermedad en melón cultivado en maceta. En cambio, el valor de peso fresco de la parte aérea tendría mayor importancia en plantas de mayor edad y cultivadas en mejores condiciones, ya que entonces sería posible obtener fructificación. En este sentido, se ha

demostrado que al disminuir la carga de frutos de las plantas de melón infectadas por *M. cannonballus* mediante aclareo, se consigue evitar la marchitez de la parte aérea, puesto que de esta manera se reduce la demanda de agua por parte de la planta (PIVONIA *et al.*, 2002). Por todo ello, el IDR se presenta como el parámetro más fiable, a la hora de explicar los efectos de cada uno de los hongos inoculados y de los tipos de suelo. Se estima, por tanto, que el peso fresco de la parte aérea no es un buen parámetro para medir la incidencia y severidad de los síntomas de “colapso” en ensayos de patogenicidad llevados a cabo en invernadero, en plantas de menos de 60 días.

Como ya se ha comentado, para el IDR no se observaron los resultados contradictorios entre los dos tipos de suelo que sí se presentaron para el peso fresco en la parte aérea. Para la explicación de estos resultados, hay que tener en cuenta la presencia en el suelo de otros hongos que podrían actuar de modo antagónico frente a los hongos asociados al “colapso”. En este sentido, se conocen bien las aptitudes de algunos géneros de hongos para el control biológico de otros agentes fúngicos, como es el caso de *Trichoderma* o de *Chaetomium* (DOMSCH y GAMS, 1972), que se aislaron en el suelo no autoclavado (datos no mostrados).

También se aislaron en el suelo no autoclavado otros hongos de carácter saprofítico como *Fusarium* y *Pythium*. Algunas especies de este género han sido citadas por algunos autores como propiamente asociadas al síndrome, y no sólo como saprofitas (PIVONIA *et al.*, 1997; TELLO *et al.*, 1990). En cual-

quier caso, el aislamiento de diversas especies de *Fusarium* y *Pythium* es un resultado que también ha aparecido en otros estudios de patogenicidad con *A. cucurbitacearum* y *M. cannonballus* (GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 1992; GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 1994b; BRUTON *et al.*, 2000a; SALES *et al.*, 2001), ya que cuando las raíces se hallan muy deterioradas, estos hongos pueden presentarse como saprofitos.

Por último, no parece que la presencia de todos los hongos asociados al colapso conjuntamente suponga un mayor deterioro de la raíz y una mayor incidencia de “colapso”; visto de otra manera, con la presencia en suelos de cultivo de melón y sandía de *M. cannonballus* o *A. cucurbitacearum*, aun por sí solos, es más que suficiente para que se produzcan ataques a las raíces de las plantas con el posterior desarrollo de los síntomas típicos de “colapso”, y con la gravedad que ha conseguido elevar a estos hongos dentro de los principales problemas de sanidad del cultivo de éstas cucurbitáceas (MERTELY *et al.*, 1991; GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 1994a y b; GARCÍA-JIMÉNEZ *et al.*, 2000). AEGERTER *et al.* (2000) destacan la idea que la presencia de los hongos causantes de “colapso” *A. cucurbitacearum*, *M. cannonballus* y *R. vagum* no es suficiente para el desarrollo del síndrome, pues hay que tener también en cuenta otros factores de tipo biótico, climático, etc. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio confirman la importancia de *M. cannonballus* y *A. cucurbitacearum*, que pueden causar daños más severos que otros hongos implicados en el síndrome del “colapso”.

ABSTRACT

BELTRÁN R., J. ARMÉNGOL, J. GARCÍA-JIMÉNEZ. 2006. Pathogenicity to muskmelon of soilborne fungi associated with cucurbit vine decline. *Bol. San. Veg. Plagas*, 32: 695-707.

Vine decline or collapse of muskmelon and watermelon can be associated to the presence on the root system of several soil-borne fungi, like *Monosporascus cannonballus*, *Acremonium cucurbitacearum*, *Rhizopycnis vagum* and *Plectosporium tabacinum*. In this study the behaviour of muskmelon inoculated with these fungi in all possible combinations among them has been studied. The inoculations were set up in sterilized and naturally infested soil. Fresh weight results showed that this is not an adequate parameter to

evaluate the pathogenicity of these fungi. Root damage index it shows like a more reliable parameter, concretely inoculations with *M. cannonballus* and/or *A. cucurbitacearum* showed more damage than inoculations with *R. vagum* and *P. tabacinum*.

Keywords: *Acremonium cucurbitacearum*, *Cucumis melo*, *Monosporascus cannonballus*, *Rhizopycnis vagum*, *Plectosporium tabacinum*.

REFERENCIAS

- AEGERTER, B. J., GORDON, T. R., DAVIS, R. M. 2000. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. *Plant Disease*, **84**: 224-230.
- ALFARO-GARCÍA, A., ARMENGOL, J., BRUTON, B. D., GAMS, W., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., MARTÍNEZ-FERRER, G. 1996. The taxonomic position of the causal agent of *Acremonium* collapse of muskmelon. *Mycologia*, **88**(5): 804-808.
- ANDRADE, D. E. G. T., MICHEREFF, S. J., BORGES, M. A. S., ARAÚJO, I. B., SALES, R. 2005. Influência da densidade de inóculo e de isolados de *Monosporascus cannonballus* na severidade do colapso do meloeiro. *Summa Phytopathologica*, **31**(2): 173-180.
- ARMENGOL, J., SANZ, E., MARTÍNEZ-FERRER, G., SALES, R., BRUTON, B. D., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 1998. Host range of *Acremonium cucurbitacearum*, cause of *Acremonium* collapse of muskmelon. *Plant Pathology*, **47**: 29-35.
- ARMENGOL, J., PELLICER, I., VICENT, A., SALES, R., BRUTON, B. D., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 2000. *Rhizopycnis vagum* D.F. Farr, un nuevo coelomycete asociado a raíces de plantas de melón con síntomas de colapso en España. *Bol. San. Veg. Plagas*, **26**: 103-112.
- ARMENGOL, J., VICENT, A., MARTÍNEZ-CULEBRAS, P., BRUTON, B. D., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 2003. Identification, occurrence and pathogenicity of *Rhizopycnis vagum* on muskmelon in Spain. *Plant Pathology*, **52**: 68-73.
- BELTRÁN, R., VICENT, A., SALES, R., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J. 2005. Population dynamics of *Monosporascus cannonballus* ascospores in marsh soils in eastern Spain. *European Journal of Plant Pathology*, **113**: 357-365.
- BIERNACKI, M., BRUTON, B. D. 2001. Quantitative response of *Cucumis melo* inoculated with root rot pathogens. *Plant Disease*, **85**: 65-70.
- BRUTON, B. D. 1995. Optimum CFU concentrations for testing pathogenicity of California cucurbit isolates of *Monosporascus cannonballus*. *Phytopathology*, **85**: 1119.
- BRUTON, B. D. 1998. Soilborne diseases in cucurbitaceae: pathogen virulence and host resistance. In: McCreight, J., Eds: Cucurbitaceae'98. American Society of Horticultural Science Press, Alex., Va. 143-166 pp.
- BRUTON, B. D., RUSSO, V. M., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., MILLER, M. E. 1998. Carbohydrate partitioning, cultural practices, and vine decline disease of cucurbits. In: Cucurbitaceae'98. McCreight, J., Ed. American Society of Horticultural Science Press, Alex., Va. 189-209 pp.
- BRUTON, B. D., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., POPHAM, T. W. 2000a. Assessment of virulence of *Acremonium cucurbitacearum* and *Monosporascus cannonballus* on *Cucumis melo*. *Plant Disease*, **84**: 907-913.
- BRUTON, B. D., POPHAM, T. W., GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J., MILLER, M. E. 2000b. Disease reaction among selected Cucurbitaceae to an *Acremonium cucurbitacearum* isolate from Texas. *Hort Science*, **35**(4): 677-680.
- COHEN, R., PIVONIA, S., BURGER, J., EDELSTEIN, M., GAMLIEL, A., KATAN, J. 2000. Toward integrated management of *Monosporascus* wilt of melons in Israel. *Plant Disease*, **84**(5): 496-505.
- DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. 1995. Basic Plant Pathology methods. Ed. Lewis Publishers. Boca Ratón. Florida (USA). 355 pp.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W. 1972. Fungi in agricultural soils. Ed. Longman, London. 290 pp.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J., MARTÍNEZ-FERRER, G., VELÁZQUEZ, M. T., ALFARO-GARCÍA, A. 1992. Evolución del aspecto de la raíz de melón y de su micoflora asociada en una parcela afectada de muerte súbita. *Phytoma España*, **41**: 13-18.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J., MARTÍNEZ-FERRER, J. 1994a. Puntos negros de las raíces de melón y sandía. En: Díaz-Ruiz, J.R., y García-Jiménez, J. Enfermedades de las cucurbitáceas en España. Ed: Phytoma-España, 155 pp.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, J., VELÁZQUEZ, M. T., JORDÁ, C., ALFARO-GARCÍA, A. 1994b. *Acremonium* species as the causal agent of muskmelon collapse in Spain. *Plant Disease*, **78**(4): 416-419.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, J., ARMENGOL, J., SALES, R., JORDÁ, C., BRUTON, B. D. 2000. Fungal pathogens associated with melon collapse in Spain. *Bulletin-OEPP*, **30**: 169-173.
- LOBO-RUANO, M. 1990. Colapso del melón producido por hongos del género *Monosporascus*. *Bol. San. Veg. Plagas*, **16**: 701-707.
- MARTYN, R. D., MILLER, M. E. 1996. *Monosporascus* root rot and vine decline: an emerging disease of melons worldwide. *Plant Disease*, **80**(7): 716-725.
- MERTELY, J. C., MARTYN, R. D., MILLER, M. E., BRUTON, B. D. 1991. Role of *Monosporascus cannonballus* and other fungi in a root rot/vine decline disease of muskmelon. *Plant Disease*, **75**: 1133-1137.
- MERTELY, J. C., MARTYN, R. D., MILLER, M. E., BRUTON, B. D. 1993. An expanded host range for the muskmelon pathogen *Monosporascus cannonballus*. *Plant Disease*, **77**: 667-673.

- MILLER, M. E., BRUTON, B. D., FARR, D. F. 1996. Association of a *Stagonospora*-like fungus on roots of melons exhibiting vine decline symptoms. *Phytopathology*, (Suppl.) **86**: s3.
- PÉREZ-PIQUERES, A. 2002. Caracterización y análisis filogenético de *Plectosporium tabacinum* (van Beyma) M.E. Palm, W. Gams et Nirenberg. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- PIVONIA, S., COHEN, R., KAFKAFI, U., BEN ZE'EV, I.S., KATAN, J. 1997. Sudden wilt of melons in southern Israel: fungal agents and relationship with plant development. *Plant Disease*, **81**(11): 1264-1268.
- PIVONIA, S., COHEN, R., KATAN, J., KIGEL, J. 2002. Effect of fruit load on the water balance of melon plants infected with *Monosporascus cannonballus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **60**: 39-49.
- SALES, R., ARMENGOL, J., VICENT, A., GARCÍA-JIMÉNEZ, J. 2001. Evaluación de daños en raíces de melón y sandía y frecuencia de aislamiento de *Acremonium cucurbitacearum* y *Monosporascus cannonballus* en una parcela afectada de colapso. *Bol. San. Veg. Plagas*, **27**: 177-183.
- TELLO, J.C., GÓMEZ, J., CAMPOROTA, P., LACASA, A. 1990. Capacidades parasitarias de *Pythium aphanidermatum* y de *Rhizoctonia solani* sobre pepino y melón. *Bol. San. Veg. Plagas*, **16**: 733-741.

(Recepción: 21 julio 2006)

(Aceptación: 20 noviembre 2006)