

Obtención y caracterización de aislados mono-esporangiales de *Olpidium bornovanus*

M. L. GUIRADO, E. SÁEZ, Y. SERRANO, J. GÓMEZ

El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) ha causado durante años una de las enfermedades más importantes en dicho cultivo. El virus, que se ha detectado también en otras especies de cucurbitáceas como son la sandía y el pepino, se transmite por las semillas de melón y por *Olpidium bornovanus*, que además parece ser por sí mismo, patógeno sobre melón.

O. bornovanus es un parásito estricto, y en plantas de melón, sandía, pepino y calabacín, se encuentra casi siempre asociado con *Olpidium brassicae* y en melón y sandía a plantas seropositivas para MNSV. Para caracterizar y evaluar el poder patógeno de varios aislados del hongo, era previamente necesario disponer de una colección de aislados originada de un solo esporangio y libre de virus. Una vez establecida dicha colección, se estudió la influencia de varias dosis de inóculo del hongo en la infección sobre plantas de melón y la conservación de MNSV en los esporangios de resistencia de *O. bornovanus*, y se caracterizaron varios aislados sobre una amplia gama de plantas pertenecientes a varias familias botánicas y sobre especies dentro de la familia *Cucurbitaceae*. La inoculación con varias dosis de zoosporas fue poco homogénea y no produjo una infección proporcional de *O. bornovanus* en las plantas de melón. Tanto *O. bornovanus* como MNSV permanecieron viables en muestras de suelos tomadas 41 y 65 meses antes. De todas las especies inoculadas sólo las pertenecientes a las cucurbitáceas resultaron colonizadas, en mayor o menor medida, por algunos de los aislados ensayados de *O. bornovanus*.

M. L. GUIRADO, E. SÁEZ, Y. SERRANO, J. GÓMEZ. Centro IFAPA La Mojonera. Camino de San Nicolás nº 1. 04745. La Mojonera (Almería). juliom.gomez@juntadeandalucia.es.

Palabras clave: Colapso, especificidad parasitaria, conservación en suelo.

INTRODUCCIÓN

Las cucurbitáceas melón (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) y calabacín (*Cucurbita pepo* L.) son especies de elevado rendimiento económico en la horticultura española. Almería es la provincia dónde se concentra la mayor parte de estos cultivos realizados de forma intensiva en invernadero. Sólo en ésta provincia, las superficies cultivadas en el año 2007 se estimaron en 4.696, 5.109, 4.036 y 4.200 ha para las especies antes citadas, respectiva-

mente (ANÓNIMO, 2008). Intensificación que origina en muchos casos la aparición de importantes enfermedades, entre ellas, las causadas por virus suelen ser las de mayor gravedad. El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), conocido también como "virus del cribado", ha causado durante años una de las enfermedades de mayor incidencia en dicho cultivo, reduciendo la producción y mermando la calidad de los frutos. En España, MNSV se detectó por primera vez en cultivos protegidos de melón en la provincia de Almería en 1984 (LUI-ARTEAGA, 1986), y desde entonces se ha

extendido por diversas zonas de Andalucía y del Levante español donde incluso se detecta en cultivos de melón realizados al aire libre (JUÁREZ *et al.*, 1993). El virus se detecta también en plantas de otras especies de cucurbitáceas cultivadas, como son la sandía y el pepino (CUADRADO *et al.*, 1993; LUIS-ARTEAGA, 1994). MNSV se transmite por las semillas de melón (GONZÁLEZ-GARZA *et al.*, 1979; AVGELIS, 1985; CAMPBELL *et al.*, 1996) y por *Olpidium radicale* (= *Olpidium bornovanus*) (TOMLINSON y THOMAS, 1986; CAMPBELL y SIM, 1994), que además, parece ser por sí mismo patógeno sobre melón (GÓMEZ, 1993; CAMPBELL y SIM, 1994). Algunos autores citan la necesaria presencia del hongo para que se pueda producir la infección de la planta por MNSV, cuando éste es transmitido por la semilla, llamando a esta especial forma de diseminación "transmisión por semilla mediante vector" (FURUKI, 1981). Otros investigadores, cuyos resultados indican que existe un pequeño porcentaje de transmisión del virus por la semilla, aunque cuando está el hongo libre de virus presente, dicho porcentaje se incrementa, propone llamar a este tipo de transmisión "por semilla asistida por vector" (CAMPBELL *et al.*, 1996).

En Almería, *O. bornovanus* y *Olpidium brassicae* son especies muy frecuentes, la primera asociada a las plantas de melón, pepino y sandía, y la segunda además de a éstas, al tomate, pimiento, berenjena y judía (GÓMEZ, 1990). *O. bornovanus* en plantas de melón y sandía se encuentra casi siempre asociado a plantas seropositivas para MNSV, se conserva en el suelo durante años, de una campaña de cultivo a otra, a profundidades mayores de los 70 cm y se detecta, en ocasiones, en los embalses utilizados para almacenar el agua de riego de los cultivos (GÓMEZ y VELASCO, 1991; GÓMEZ *et al.*, 1993). "La muerte súbita" del melón y de la sandía se comenzó a observar en Almería al inicio de la década de los 80. Los síntomas generalizados más característicos de la enfermedad son necrosis radicular y del hipocotilo, marchitez y muerte, masiva y

repentina de las plantas durante la maduración de los frutos, sin que éstas antes de su marchitez, hubiesen mostrado ningún otro síntoma de enfermedad. La similitud en algunos de sus síntomas con una enfermedad descrita en Grecia y Japón por Avgelis (1985) e HIBI y FURUKI (1985), respectivamente, la detección en las plantas enfermas en 1984 del virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) (LUIS, 1986, 1994), y la presencia en todos los invernaderos con plantas enfermas de su vector, *O. bornovanus* (GÓMEZ, 1990), hizo sospechar que los síntomas observados en Almería fuesen causados por el propio virus (GÓMEZ *et al.*, 1988). Hipótesis que se confirmó en melón, siendo MNSV capaz de originar la muerte repentina de las plantas antes o cuando éstas entran en producción. Capacidad que se manifestó tanto cuando el virus se inoculó mecánicamente, como cuando la infección se produjo a través de su vector. Existiendo, no obstante, una diferencia sintomatológica importante: cuando el MNSV se inoculó mecánicamente indujo, en un porcentaje elevado de las plantas, el síntoma de cribado (manchas necróticas) en las hojas apicales. Sin embargo, al inocularlo a través de *O. bornovanus* el síntoma más frecuente fue una necrosis del hipocotilo, que se extendió a partir de la raíz hasta la inserción de los cotiledones con el tallo (GÓMEZ, 1993). En sandía, por el contrario, parece necesaria la acción conjunta de *O. bornovanus* y de MNSV para provocar la muerte de las plantas (GUIRADO *et al.*, datos no publicados). Además, los resultados obtenidos en varios de los experimentos realizados con esa finalidad, sugirieron la patogenia de *O. bornovanus*, incluso cuando éste no es portador de MNSV. Para comprobar dicha patogenia será necesario disponer de aislados mono-esporangiales del hongo libre de virus.

La gama de plantas que son infectadas por diversos aislados masales o mono-esporangiales de *O. bornovanus* es muy variable. Algunos aislados son muy polífagos e infectan a especies de plantas pertenecientes a muchas familias (LANGE y INSUNZA, 1977),

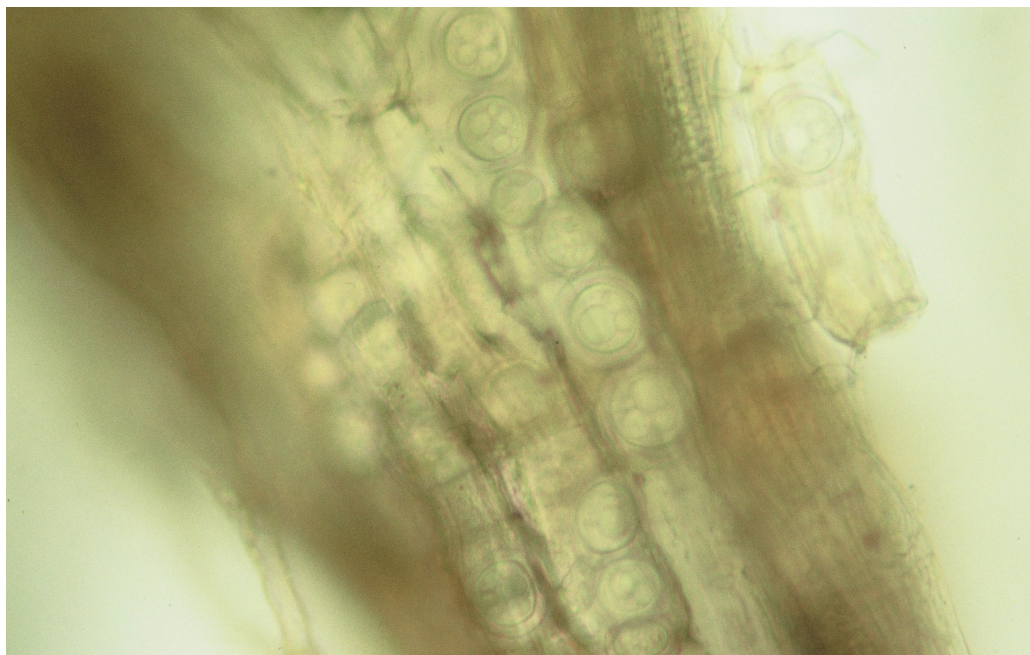


Figura 1. Esporangios de resistencia de *Olpidium bornovanus*.

otros aislados, sólo a especies de la familia de las cucurbitáceas (BARR, 1968) y otros con una gama mucho más reducida y capaces de multiplicarse con normalidad “casi especializadas” en sólo pocas especies de plantas (CAMPBELL y SIM, 1994).

Los objetivos pretendidos con el trabajo realizado fueron: 1) Obtener una colección de aislados masales de *O. bornovanus* procedentes de plantas de melón, pepino, sandía y calabacín, para establecer otra, de aislados mono-esporangiales. 2) Estudiar la influencia de varias dosis de inóculo del hongo en la infección sobre plantas de melón. 3) Verificar la conservación de MNSV en los esporangios de resistencia de *O. bornovanus*. 4) Obtener aislados mono-esporangiales de *O. bornovanus* libres de virus. Y 5) Caracterizar varios aislados mono-esporangiales de *O. bornovanus* sobre una amplia gama de plantas pertenecientes a varias familias botánicas diferentes y sobre plantas pertenecientes a las cucurbitáceas.

MATERIAL Y MÉTODOS

La detección de *O. bornovanus* se realizó, después de lavar el sistema radicular de las plantas con abundante agua del grifo para eliminar la mayor parte del suelo o sustrato adherido a ellas, seleccionando 10 pequeños trozos, de aproximadamente 1 mm de diámetro y 1 cm de longitud y observándolos mediante un microscopio óptico con 100-400 aumentos. Los análisis para la detección MNSV se realizaron con tejidos de la base del tallo de las plantas por la técnica inmunoenzimática ELISA DAS descrita por CLARK y ADAMS (1977), con antisueros de la firma Loewe. Las plantas para los diferentes experimentos se cultivaron en una cámara de cultivo con temperatura, humedad y fotoperíodo controlado o en un invernadero multitúnel de ambiente semicontrolado con cubierta de placas de metacrilato y temperaturas comprendidas entre los 10-12 y 28-32°C. Para el riego del invernadero se utilizó un depósito de 1 m³

de capacidad donde se preparaba la solución final de riego. Mediante una bomba y con la ayuda de unos relojes programables, la solución nutritiva fue aportada a cada planta, con un sistema de goteros de $2,4 \text{ l/h}^{-1}$, microtubos y piquetas.

Obtención de aislados masales y mono-esporangiales de *O. bornovanus*. Para obtener la colección de aislados masales de *O. bornovanus* se realizó una prospección durante los años 1999-2001 en invernaderos cultivados de melón, pepino, sandía y calabacín de la provincia de Almería. De cada uno de ellos se recogieron muestras de raíces y de suelo de la zona de la rizosfera para detectar la presencia del hongo en plantas con y sin síntomas de MNSV. En el caso de detectar la presencia de esporangios de resistencia de *O. bornovanus* (Figura 1), la muestra de suelo correspondiente, se dejó secar durante al menos un mes en condiciones de laboratorio sobre papel de filtro, y se dividió en dos. Una se utilizó para multiplicar el hongo y la otra se conservó a temperatura ambiente. La base del tallo de las plantas recolectadas se analizaron para MNSV. La multiplicación de los aislados masales de *O. bornovanus* se realizó en la cámara de cultivo a temperatura constante de 30°C con un fotoperíodo de 14 horas de luz (2.000-3.000 lux) o en el invernadero. Las plantas se cultivaron en contenedores de 11, rellenos con vermiculita esterilizada, previamente inoculada con 20 g de cada muestra de suelo. Se colocaron dos plantas por contenedor de la especie que se estaba cultivando en el invernadero, en el momento de la toma de muestra de plantas y suelo. Entre los contenedores se intercalaron otros con plantas de las mismas especies sin inocular, para que pudieran servir de testigos en caso de alguna eventual contaminación. Las semillas de melón y de sandía fueron analizadas previamente por serología para detectar su posible contaminación por MNSV. Los cultivares utilizados de melón fueron Gallicum, Regal y Primal, mientras que para pepino, sandía y calabacín se utilizaron

Nevada, Sugar Baby y Elite, respectivamente. Las plantas se mantuvieron durante un mes en la cámara de cultivo y durante dos meses en el invernadero, transcurridos los cuales se trasladaron al laboratorio donde se lavaron las raíces con agua del grifo, se observaron al microscopio para verificar la presencia de *O. bornovanus* y se analizaron por serología para MNSV. Posteriormente, las raíces de las plantas infectadas con esporangios de resistencia de *O. bornovanus* se secaron durante al menos tres semanas a temperatura ambiente de laboratorio y se conservaron a $4-8^{\circ}\text{C}$.

Para establecer la colección de aislados mono-esporangiales de *O. bornovanus* se utilizó una adaptada de la propuesta por Lin *et al.* (1970) para la obtención de aislados mono-esporangiales de *O. brassicae*. Para conseguir una liberación masiva de zoosporas de las raíces de las plantas inoculadas con los diferentes aislados masales de *O. bornovanus*, se seleccionó un volumen radicular con abundantes esporangios maduros del hongo (Figura 2), y se colocó en una placa de Petri, que fue sellada posteriormente. Después de su incubación en un fitotrón a 30°C durante 24 horas con un fotoperíodo de 14 horas de luz, las raíces se sumergieron en 150 ml de agua estéril. La concentración de zoosporas liberadas fue estimada tras cuatro replicas con la ayuda de una cámara de recuento tipo Thoma. Al volumen estimado para contener 10^5 zoosporas se le añadió agua destilada estéril hasta completar los 50 ml, volumen con el que se inoculó una nueva planta crecida en un Erlenmeyer de 100 ml de capacidad con solución nutritiva. A los cuatro días de la inoculación y tras comprobar la infección de las raíces por los esporangios de *O. bornovanus*, 5 trozos de raíces de 1 cm de longitud se trituraron con un politrón en 1 cm^3 de agua destilada estéril fría ($4-8^{\circ}\text{C}$). El triturado se filtró a través de un tamiz de 0,075 micras de luz previamente enfriado a $4-8^{\circ}\text{C}$, y el filtrado se dilaceró en una placa de Petri con medio de cultivo agar-agua a la misma temperatura. La placa se observó con la ayuda de un microscopio

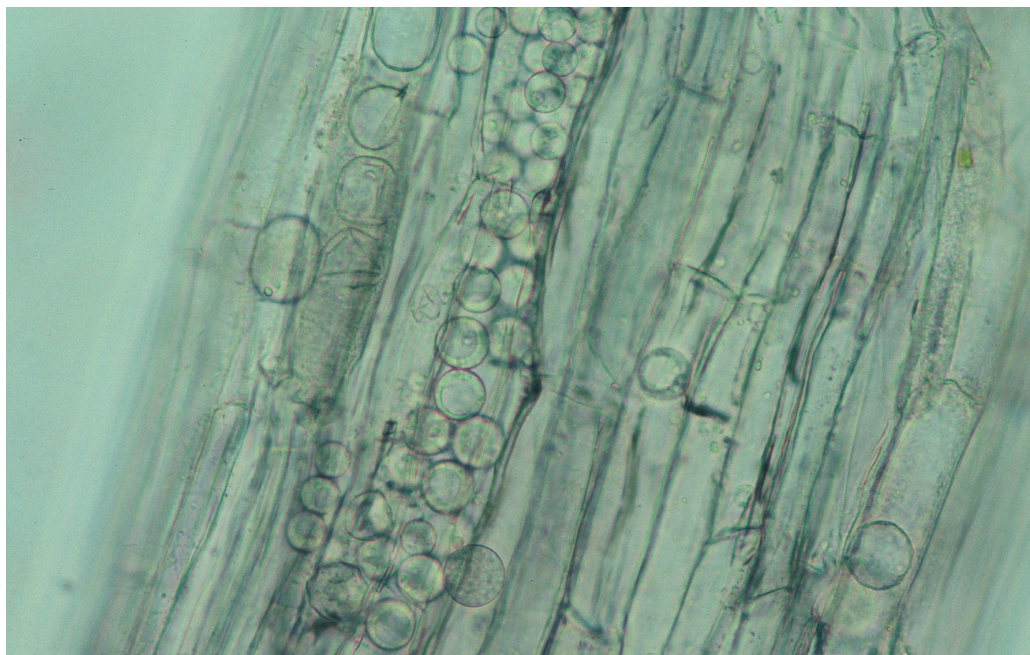


Figura 2. Esporangios de *O. bornovanus*.

óptico y, una vez localizado un esporangio maduro y aislado, se cortó el trozo de agar que lo contenía y se colocó en un portaobjetos para confirmar la presencia de un solo esporangio. Otra planta, también crecida en Erlenmeyer, se inoculó con el trozo de agar y se incubó en un fitotrón con un fotoperíodo de 14 horas de luz y a una temperatura constante de 30°C. Diez días después, las raíces de la planta inoculada se observó para comprobar si se había producido una nueva infección. En los casos de éxito, la planta se dejó crecer hasta que se detectó la presencia de esporangios de resistencia, tras lo cual, el sistema radicular de la planta se desinfectó con una solución de hipoclorito sódico al 0,15% durante 10 minutos. Después de dos enjuagues con agua destilada estéril durante tres minutos, el sistema radicular de la planta se dejó secar en papel de filtro a temperatura ambiente durante siete días y después se conservó en tubos de cristal en frigorífico a 4-8°C.

Influencia de la dosis de inóculo de *O. bornovanus* en la colonización radicular.

Para estudiar la influencia de varias dosis de inóculo de *O. bornovanus* en la infección sobre plantas de melón se inocularon plantas del cv. Regal crecidas en contenedores de 300 ml de capacidad. Las diferentes dosis de zoosporas se consiguieron con la metodología descrita en el apartado anterior. El experimento se realizó con el aislado monoesporangial Or-237-ss obtenido de melón, con un diseño en cuatro bloques completos al azar con medidas repetidas, inoculando cada contenedor con 0, 10⁴, 10⁵ y 10⁶ zoosporas en 50 ml de agua estéril. Las plantas se mantuvieron durante 15 días en cámara de cultivo a 22-28°C y un fotoperíodo de 14 horas, tras los cuales se procedió a la cuantificación de los esporangios, esporangios de resistencia y de las zoosporas liberadas de todo el sistema radicular de las plantas. Los dos primeros contando, bajo microscopio óptico, el número de ellos presentes en

diez trozos de raíz de aproximadamente 1mm de diámetro y de 1cm de longitud de cada una de las plantas. Las zoosporas se cuantificaron con la ayuda de una cámara Thoma. El análisis de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza y la correlación entre la dosis de inóculo y la suma de los esporangios y esporangios de resistencia, mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Conservación de *O. bornovanus* y MNSV en muestras de suelo. Para estudiar la capacidad de conservación de *O. bornovanus* y de MNSV se realizaron dos experimentos en invernadero. En el primero se utilizó una muestra de suelo tomada 41 meses antes del inicio del experimento y en el segundo otra muestra tomada 65 meses antes. Ambas procedentes de invernaderos con plantas infectadas con *O. bornovanus* y seropositivas para MNSV. Las muestras de suelo, después de ser secadas a la temperatura ambiente del laboratorio durante 4 semanas, se conservaron en bolsas de plástico cerradas herméticamente en el laboratorio. Plantas de melón, procedentes de semillas obtenidas de frutos de plantas del cv. Galia, sin síntomas, en las que no se había detectado *O. bornovanus* y seronegativas para MNSV (semillas libres de virus), se cultivaron en contenedores de 1 L rellenos con vermiculita previamente inoculada con 20 g de suelo. Se utilizaron diez contenedores para cada muestra de suelo. Como testigos se utilizaron en cada uno de los experimentos otros diez contenedores sin inocular. Los contenedores se dispusieron con un diseño experimental completamente aleatorio. A los setenta días de la siembra las plantas se recolectaron y se analizaron para *O. bornovanus* y MNSV. Al día siguiente y sobre los mismos contenedores se realizó una nueva siembra con semillas de la misma procedencia. En esta ocasión las plantas se mantuvieron en el invernadero durante 55 días, al final de los cuales se realizó de nuevo un análisis para *O. bornovanus* y MNSV.

Obtención de aislados de *O. bornovanus* libres de MNSV. Evaluación de su poder patógeno. Para la obtención de aislados de melón de *O. bornovanus* libres de virus, se realizaron cinco inoculaciones sucesivas con zoosporas de tres aislados mono-esporangiales del hongo (Or-201-ss, Or-202-ss2 y Or-205-ss) sobre plantas de melón del cv. Primal (gen nsv/nsv) resistente a MNSV. Entre la inoculación de las plantas y la liberación de zoosporas para realizar una nueva inoculación transcurrió un periodo de 30 días. Después de la última inoculación, tras detectar los esporangios de resistencia del hongo, las raíces de las plantas se secaron y conservaron a 4-8°C. Para comprobar la ausencia de MNSV y caracterizar la patogenia de varios aislados mono-esporangiales de *O. bornovanus* sobre melón, pepino y sandía se realizaron dos experimentos, consistentes en inocular sucesivamente plantas, con una suspensión conteniendo 10^6 zoosporas. A los 15 días de la primera inoculación, tras la liberación masiva de las zoosporas de su sistema radicular en 100 ml de agua estéril, recuento de su concentración con la ayuda de una cámara Thoma y posterior calculo del volumen que pudiera contener 10^6 zoosporas, otras plantas de la misma especie en cada caso, fueron nuevamente inoculadas. Se realizaron dos y cuatro inoculaciones sucesivas y se utilizaron seis y siete aislados en el primer y segundo experimento, respectivamente. Los experimentos se realizaron en cámara de cultivo, con temperaturas de 18-24°C y un fotoperíodo de 14 horas de iluminación (2.000-3.000 lux), con un diseño experimental de tres bloques al azar y utilizando como parcela elemental un contenedor con vermiculita y dos plantas. Las plantas inoculadas de melón, pepino y sandía, procedentes de semillas seronegativas para MNSV, pertenecieron a los cvs. Regal, Corona y Sugar Baby, respectivamente. Al final de cada periodo las plantas se analizaron también para MNSV. Como testigos se utilizaron plantas de las tres especies sin inocular. Para comprobar la transmisión del virus por el hongo en las condiciones de

cultivo ensayadas, un mismo número de plantas de cada una de las tres especies se inocularon mediante riego del sustrato con 10 ml de una solución preparada a partir de 10 ml de un extracto del virus en tampón NaHPO_4 0,03M, pH=8,5 y dilución 15:1 (p/v), mezclada con 90 ml de una suspensión con $2 \cdot 10^4$ zoosporas ml^{-1} del aislado Or-205-ss del hongo.

Especificidad parasitaria de *O. borno-vanus*. Para conocer la gama de plantas hospedadoras de siete aislados monoesporangiales de *O. borno-vanus*, dos obtenidos de melón, dos de pepino, dos de sandía y uno de calabacín, se realizó un experimento que consistió en inocular, con zoosporas de los

diferentes aislados del hongo, las siguientes especies de plantas: *Beta vulgaris*, *Brassica oleracea*, *Capsicum annum*, *Cucumis sativus*, *Cucumis melo*, *Cucurbita ficifolia*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo*, *Citrullus lanatus*, *Festuca pratensis*, *Lactuca sativa*, *Lagenaria siceraria*, *Lepidium sativum*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana clevelandii*, *Phaseolus vulgaris*, *Petroselinum crispum*, *Petroselinum hortense*, *Phleum pratense*, *Secale cereale*, *Solanum melongena*, *Solanum villosum*, *Spinacea oleracea*, *Trifolium incarnatum*, *Trifolium pratense*, *Triticum aestivum*, *Vicia faba*, *Vigna sinensis* y *Zinnia elegans*. El experimento se realizó en invernadero y las semillas se sembraron en contenedores de un litro de capacidad

Cuadro 1. Aislados monoesporangiales obtenidos, procedencia, código y porcentaje de éxito con la técnica utilizada.

<u>Nº aislado</u>	<u>Nº de plantas Inoculadas con 1 esporangio</u>	<u>Nº de plantas infectadas</u>	<u>% de aislamiento</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Codificación</u>
Or-201	5	1	20	Melón (Is)**	Or-201ss
Or-202	5	2	40	Melón (Is)	Or-202ss1 y Or-202ss2
Or-203	6	0	0	Melón(AI) *	
Or-204	8	0	0	Melón (AI)	
Or-205	5	1	20	Melón (AI)	Or-205ss
Or-207	7	1	14,3	Pepino (AI)	Or-207ss
Or-208	10	0	0	Pepino (AI)	
Or-211	5	2	40	Pepino (AI)	Or-211ss1 y Or-211ss2
Or-213	7	0	0	Sandía (AI)	
Or-214	8	0	0	Sandía (AI)	
Or-219	6	0	0	Sandía (AI)	
Or-225	16	2	12,5	Sandía (AI)	Or-225ss1 y Or-225ss2
Or-227	8	2	40	Pepino (AI)	Or-227ss1 y Or-227ss2
Or-230	28	0	0	Melón (AI)	
Or-231	13	0	0	Pepino (AI)	
Or-233	13	0	0	Melón (AI)	
Or-234	9	2	50	Sandía (AI)	Or-234ss1 y Or-234ss2
Or-236	10	0	0	Sandía (AI)	
Or-237	12	5	41,67	Melón (AI)	Or-237ss1 a Or-237ss5
Or-239	8	1	12,5	Calabacín (AI)	Or-239ss
Or-241	9	0	0	Calabacín (AI)	
TOTAL	193	19	9,84		

(Is)** = Israel; (AI)* = Almería

rellenados con vermiculita esterilizada, colocándose una semilla por contenedor en el caso de plantas de las especies *B. vulgaris*, *B. oleracea*, *C. sativus*, *C. melo*, *C. ficifolia*, *C. maxima*, *C. pepo*, *C. lanatus*, *L. siceraria*, *L. esculentum*, *P. vulgaris*, *S. melongena*, *S. Villosum* y *V. Faba*, cuatro semillas en el caso de *C. annum* y *L. sativa* y de 10 a 20 semillas en el resto. Cada contenedor se inoculó con 10^3 - $3,2 \cdot 10^8$ zoosporas de los aislados monoesporangiales. Como testigos se utilizaron plantas de cada una de las especies utilizadas sin inocular. Las plantas se mantuvieron durante 31-33 días tras los que se evaluó la presencia de *O. bornovanus* en las raíces y, sólo en las especies pertenecientes a las cucurbitáceas, se realizó el análisis por serología para MNSV.

RESULTADOS

Obtención de aislados masales y monoesporangiales de *O. bornovanus*. Se recolectaron un total de 35 aislados de *O. bornovanus*, 18 de ellos fueron obtenidos de melón, ocho de sandía, cinco de pepino y cuatro de calabacín. La mayoría (29) procedían de invernaderos de Almería y los restantes, de las provincias de Murcia y Valencia (costa mediterránea de España), de Marruecos, mientras que otros dos los cedió el Dr. Pivonia como procedentes de Israel. El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) se detectó en plantas procedentes del 73,1% de los invernaderos prospectados. Todos los aislados de *O. bornovanus* se multiplicaron sobre la misma especie de la que se habían obtenido. Aunque las muestras de

suelo procedentes de los invernaderos comerciales se habían dejado secar durante tres semanas sobre papel de filtro en el laboratorio, en un alto porcentaje de las plantas de melón y sandía se detectó MNSV. La técnica modificada de Lin *et al.* (1970) fue efectiva sólo en el 9,8% de los casos para establecer aislados monoesporangiales de *O. bornovanus*. De los 193 intentos realizados, sólo se consiguieron 19 aislados monoesporangiales. Aunque con algunos de los aislados el porcentaje de éxito obtenido superó el 40%, con más de la mitad de los aislados utilizados no se consiguió infección. De los 10 conseguidos de explotaciones diferentes, cuatro fueron obtenidos de melón, tres de pepino, dos de sandía y uno de calabacín (Cuadro 1).

Influencia de la dosis de inóculo de *O. bornovanus* en la colonización radicular.

Los resultados obtenidos al inocular con 0, 10^4 , 10^5 y 10^6 zoosporas del aislado Or-237 sobre plantas de melón se encuentran reflejados en el Cuadro 2. La inoculación con una dosis de inóculo de 10^4 zoosporas no fue siempre eficaz para producir la infección de *O. bornovanus* en las plantas, mientras que en uno de los bloques se contabilizaron 1300 entre esporangios y esporangios de resistencia del hongo, en otro no se observaron esporangios ni se observó liberación de zoosporas. Aunque las cantidades de esporangios medida, 356,75, 475,75 y 623,50 para las dosis de 10^4 , 10^5 y 10^6 , respectivamente, fueron algo mayores en las dosis de inóculo más elevadas, el aumento no fue proporcional a las dosis, ni las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas. La canti-

Cuadro 2. Media del nº de esporangios de resistencia, esporangios y de zoosporas liberadas al inocular con varias dosis de inóculo.

Dosis de inóculo	Esporangios de resistencia	Esporangios	Esporangios + Esporangios de resistencia	Zoosporas
0	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
10^4	4,75 a	356,75 a	361,50 a	$2,81 \cdot 10^7$ a
10^5	50,25 a	475,75 a	526,00 a	$1,98 \cdot 10^7$ a
10^6	16,50 a	623,50 a	640,00 a	$2,70 \cdot 10^7$ a

Valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (P=0,05).

dad de esporangios de resistencia observada fue escasa y no dependió totalmente, al igual que la de zoosporas liberadas del sistema radicular de las plantas y de la dosis de inóculo empleada. *O. bornovanus* no se detectó en las plantas del testigo no inoculado. El coeficiente de Pearson obtenido entre las dosis de inóculo y la cantidad de esporangios producidos fue de 0,2058 y el obtenido entre el número estimado de propágulos del hongo y la cantidad de zoosporas liberadas fue de 0,7688, que aunque no fue tan bajo como el anterior, tampoco permitió establecer una correlación entre ambas variables.

Conservación de *O. bornovanus* y MNSV en muestras de suelo. La capacidad de conservación de *O. bornovanus* y MNSV en suelo se puso de manifiesto en los dos experimentos realizados. En el primero de ellos, en el que se utilizó una muestra de suelo tomada 41 meses antes del inicio del experimento, a partir de los 50 días de la siembra algunas de las plantas comenzaron a mostrar estrías necróticas en el tallo y necrosis del hipocotilo. A los setenta días de la siembra, *O. bornovanus* se detectó asociado a una importante necrosis del sistema radicular, en todas las plantas cultivadas en ver-

miculita previamente inoculada con la muestra de suelo. MNSV se detectó también en el 50% de las plantas. A los pocos días de la segunda siembra y en un porcentaje elevado de las plántulas se observaron estrías necróticas sobre el tallo, necrosis del hipocotilo, marchitez y muerte. MNSV se detectó ahora en el 100% de las plantas crecidas en la muestra de suelo. Ni MNSV, ni *O. bornovanus* se detectaron en las plantas del testigo no inoculado. En el segundo experimento ninguna de las plantas de la primera siembra, crecidas en las muestras de suelo tomadas 65 meses antes, mostró síntomas ni fue seropositiva para MNSV. *O. bornovanus* se detectó en todas las plantas cultivadas en vermiculita con suelo, mientras que no se detectó en las plantas del testigo. Después de la segunda siembra algunas de las plantas comenzaron a mostrar síntomas de MNSV, detectándose el virus en todas las plantas. Ni *O. bornovanus* ni MNSV se detectó en las plantas del testigo no inoculado.

Obtención de aislados de *O. bornovanus* libres de MNSV. Evaluación de su poder patógeno. Al inocular consecutivamente cinco veces con zoosporas de *O. bornovanus* plantas de melón del cv. Primal

Cuadro 3. Patogenia de aislados monoesporangiales de *O. bornovanus* sobre melón, pepino y sandía y detección de MNSV (Experimento 1).

Aislados	Inocul.	Melón		Pepino		Sandía	
		<i>O. born.</i>	MNSV	<i>O. born.</i>	MNSV	<i>O. born.</i>	MNSV
Or-201-ssP	1 ^a	+++	1/3	++	0/3	++	0/3
(Melón)	2 ^a	++	3/3	0	1/3	++	0/3
Or-202-ss2P	1 ^a	+++	0/3	++	0/3	++	0/3
(Melón)	2 ^a	+++	1/3	+	0/3	++	0/3
Or-205-ssP	1 ^a	+++	0/3	n.i.	0/3	++	0/3
(Melón)	2 ^a	++	0/3		0/3	++	0/3
Or-207-ss	1 ^a	++	0/3	+++	0/3	++	0/3
(Pepino)	2 ^a	n.i.	0/3	++	0/3	+	0/3
Or-211-ss	1 ^a	++	0/3	+++	0/3	++	0/3
(Pepino)	2 ^a	0	0/3	++	0/3	+	0/3
Or-227-ss	1 ^a	++	0/3	+++	0/3	++	0/3
(Pepino)	2 ^a	n.i.	0/3	++	0/3	+	0/3

n.i.= No infección; 0= Pocos esporangios sin liberación de zoosporas. +++≥10⁵ zoosporas ml⁻¹. ++ =entre 10⁴ y 10⁵ zoosporas ml⁻¹. +≤10⁴ zoosporas ml⁻¹

(resistente a MNSV), se obtuvieron tres aislados monoesporangiales de melón que se codificaron como Or-201-ssP, Or-202-ss2P y Or-205-ssP. La patogenia de algunos de los aislados monoesporangiales de *O. bornovanus* sobre melón, pepino y sandía se puso de manifiesto en los dos experimentos realizados. En el primero (Cuadro 3), en el que se inocularon seis aislados monoesporangiales, tres obtenidos de melón y otros tres de pepino y se realizaron dos sucesivas inoculaciones con zoosporas, los aislados de melón se multiplicaron bien ($\geq 10^4$ zoosporas) en melón y sandía. Sobre pepino, los aislados Or-201-ssP y Or-202-ss2P, se multiplicaron en la primera de las inoculaciones, y tuvieron más dificultad en la segunda, donde en uno de ellos no se observó la liberación de zoosporas en los escasos esporangios observados. El aislado Or-205-ssP no causó infección. Los aislados de pepino se multiplicaron bien ($\geq 10^4$ zoosporas) en pepino y moderadamente bien en sandía. En melón los tres aislados se multiplicaron bien en la primera inoculación, pero dos de ellos no lo hicieron en la segunda y el tercero formó escasos esporangios en los que no se observó liberación de zoosporas. MNSV se detectó en todas las repeticiones de melón y en una de pepino de las inoculadas con el aislado Or-201-ssP y en una de las repeticiones de melón inoculadas con el aislado Or-202-ss2P. En el segundo experimento (Cuadro 4), en el que se usaron los seis aislados inoculados anteriormente junto con otro obtenido de sandía y en el que se realizaron cuatro sucesivas inoculaciones, los aislados de melón se multiplicaron bien en melón y sandía, mientras que sobre pepino se multiplicaron con dificultad en la primera de las inoculaciones y no se observó infección alguna en la segunda. Por su parte, los aislados de pepino lo hicieron bien sobre pepino y mal en sandía, en la que incluso el aislado Or-207-ss en una de las repeticiones no causó infección. Sobre melón los tres aislados se multiplicaron aunque mal en la primera inoculación y no lo hicieron en la segunda. El aislado de san-

día se multiplico mejor en melón que en pepino y sandía. MNSV sólo se detectó en plantas de sandía inoculadas con el aislado Or-234-ss1 obtenido en sandía., y en las que por poseer un reducido sistema radicular *O. bornovanus* se detectó con bastante dificultad.

Las plantas de melón y sandía inoculadas con un extracto del virus y zoosporas del aislado Or-205-ss de *O. bornovanus*, también presentaron un escaso y deteriorado sistema radicular. Y aunque el hongo no se observó en las plantas inoculadas, en todas ellas se detectó MNSV. Las raíces de las plantas de pepino inoculadas no mostraron síntomas, *O. bornovanus* no se observó en el sistema radicular pero en todas se detectó MNSV. En ambos experimentos, en las plantas de los testigos no inoculados (datos no mostrados en los cuadros) no se detectó *O. bornovanus* ni MNSV.

Especificidad parasitaria de *O. bornovanus*. Parte de los resultados obtenidos al caracterizar varios aislados monoesporangiales de *O. bornovanus* sobre una amplia gama de plantas se encuentran reflejados en la Cuadro 5. De todas las especies inoculadas sólo las pertenecientes a las cucurbitáceas (*C. melo*, *C. sativus*, *C. lanatus*, *L. siceraria*, *C. ficifolia*, *C. maxima*, *C. pepo*), resultaron colonizadas, en mayor o menor medida, por algunos de los aislados ensayados de *O. bornovanus*. Sin embargo, no todos los aislados del hongo, ni siquiera los procedentes de una especie concreta, se multiplicaron sobre la misma gama de plantas hospedadoras. El aislado Or-237-ss obtenido de melón se multiplicó bien en todas las cucurbitáceas excepto en pepino, mientras que el Or-205-ss sólo lo hizo sobre melón, *L. siceraria* y *C. ficifolia*. Los dos aislados obtenidos de pepino (Or-207-ss y Or-211-ss) lo hicieron sobre melón, pepino y *C. ficifolia*, mientras que el Or-207-ss se multiplicó además en sandía, *L. siceraria* y *C. pepo*. El obtenido en sandía infectó melón, sandía, *L. siceraria* y *C. ficifolia*, mientras que el de calabacín infectó a sandía, *C. maxima* y *C. pepo*. *O. bornovanus*

Cuadro 4. Patogenia de aislados monoesporangiales de *O. bornovanus* sobre melón, pepino y sandía y detección de MNSV (Experimento 2).

Aislados	Melón		Pepino		Sandía		
	Inocul.	<i>O. born.</i>	MNSV	<i>O. born.</i>	MNSV	<i>O. born.</i>	MNSV
Or-201-ssP (Melón)	1 ^a	+++	0/3	+	0/3	++	0/3
	2 ^a	++++	0/3	+ ⁿⁱ	0/3	++	0/3
	3 ^a	+++	0/3	+	0/3	+++	0/3
	4 ^a	++++	0/3	+	0/3	+++	0/3
Or-202-ss2P (Melón)	1 ^a	++	0/3	++	0/3	++	0/3
	2 ^a	++	0/3	n.i.	0/3	++	0/3
	3 ^a	++	0/3	-	0/3	+	0/3
	4 ^a	+++	0/3	-	0/3	++	0/3
Or-205-ssP (Melón)	1 ^a	+++	0/3	+++	0/3	++	0/3
	2 ^a	++	0/3	+	0/3	++	0/3
	3 ^a	++	0/3	+	0/3	++	0/3
	4 ^a	+++	0/3	+	0/3	++	0/3
Or-207-ss (Pepino)	1 ^a	+	0/3	+++	0/3	++	0/3
	2 ^a	n.i.	0/3	+++	0/3	+ ⁿⁱ	0/3
	3 ^a	-	0/3	++	0/3	+ ⁿⁱ	0/3
	4 ^a	-	0/3	+++	0/3	+ ⁿⁱ	0/3
Or-211-ss (Pepino)	1 ^a	+	0/3	+++	0/3	+	0/3
	2 ^a	n.i.	0/3	++	0/3	+	0/3
	3 ^a	-	0/3	+++	0/3	+	0/3
	4 ^a	-	0/3	++++	0/3	++	0/3
Or-227-ss (Pepino)	1 ^a	+	0/3	+++	0/3	++	0/3
	2 ^a	n.i.	0/3	+++	0/3	+	0/3
	3 ^a	-	0/3	++++	0/3	+	0/3
	4 ^a	-	0/3	++	0/3	++	0/3
Or-234-ss1 (Sandía)	1 ^a	++	0/3	++	0/3	++	0/3
	2 ^a	+++	0/3	+	0/3	+ ²	2/3
	3 ^a	++	0/3	+	0/3	+ ²	2/3
	4 ^a	+++	0/3	++	0/3	+ ²	0/3
Or-205-ss + MNSV	1 ^a	+ ²	3/3	n.i.	3/3	+ ²	3/3
	2 ^a	+ ²	3/3	n.i.	3/3	+ ²	3/3
	3 ^a	+ ²	3/3	n.i.	3/3	+ ²	3/3

Se expresan los datos medios sobre la concentración de zoosporas de *O. bornovanus* liberadas del sistema radicular de las plantas y la detección de MNSV. ++++≥10⁶ zoosporas ml⁻¹; +++≥10⁵ zoosporas ml⁻¹; ++ =entre 10⁴ y 10⁵ zoosporas ml⁻¹; +≤10⁴ zoosporas ml⁻¹. n.i.= No infección .+ⁿⁱ = No infección en alguna de las repeticiones .+² = Plantas con escaso y deteriorado sistema radicular.

no se detectó en ninguna de las plantas no inoculadas. MNSV se detectó en algunas de las plantas de melón y de pepino y en todas las plantas de sandía, incluso en las inoculadas con los aislados Or-205-ss y Or-211-ss en las que no se detectó *O. bornovanus* y en la del testigo no inoculado. La detección del

virus en las plantas de sandía sugiere la transmisión de éste por las semillas. Por el contrario el virus no se detectó en *C. ficifolia*, *C. maxima*, *C. pepo* ni *L. siceraria*. MNSV también se detectó en las plantas de melón y pepino inoculadas con el aislado Or-239-ss de calabacín, a pesar de que el hongo

no se detectó en el sistema radicular de ninguna de las plantas.

DISCUSIÓN

O. bornovanus se detectó con facilidad en la mayoría de las plantas de todas las explotaciones prospectadas, confirmando la ubicuidad del hongo en los suelos de los invernaderos de la provincia de Almería (GÓMEZ y VELASCO, 1991). El hongo se multiplicó adecuadamente sobre plantas cultivadas en vermiculita de la misma especie en la que fueron obtenidos tanto en cámara de cultivo como en invernadero de ambiente controlado. La técnica utilizada resultó eficaz para aislamiento de *O. bornovanus* y MNSV de los suelos contaminados.

El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) causa una enfermedad que produce importantes pérdidas económicas en Almería y en otras zonas de cultivo de melón de las comunidades de Andalucía y Valenciana (CUADRADO *et al.*, 1993; JUÁREZ *et al.*, 1993). El estudio para obtener los aislados masales y a partir de ellos los monoesporangiales confirmó la amplia distribución del MNSV en los cultivos de sandía y melón. En 19 invernaderos de los 26 muestreados se detectó el virus.

El porcentaje de infección conseguido al inocular plantas con un solo esporangio fue bajo al compararlos con los obtenidos (entre el 40 y 90%), por LIN *et al.* (1970) con esporangios de *Olpidium brassicae*. A pesar de que la inoculación se realizó sobre plantas con las raíces sumergidas en una solución nutritiva, medio propuesto como favorable para la movilidad y encuentro de las zoosporas con las raíces de la planta a infectar. La infección de las plantas de melón por *O. bornovanus* y la cantidad de zoosporas liberadas del sistema radicular no dependieron estrechamente de la dosis utilizada para inocular. El hecho de que en ocasiones al inocular con 10^4 zoosporas no se observara infección de las plantas, parece explicar en cierta medida las dificultades encontradas para conseguir los aislados monoesporangiales. La hetero-

geneidad encontrada en la infección entre las diferentes submuestras del sistema radicular por el hongo, similar a la encontrada al observar al microscopio las raíces de plantas infectadas en condiciones naturales, en la que existen zonas con una alta concentración de esporangios y de esporangios de resistencia del hongo, mientras que en otras, muy próximas entre sí, la cantidad de estas estructuras es escasa o nula, parece indicar que otros factores, como la edad de la planta o de la raíz, o lugares concretos de infección son más determinantes en la infección que la dosis de inóculo.

La capacidad de conservación de *O. bornovanus* en el suelo y en las raíces de las plantas a las que infecta, durante un largo periodo de tiempo, ha sido puesta de manifiesto por varios investigadores (DIAS, 1969; TOMLINSON y THOMAS, 1986; GÓMEZ *et al.*, 1993; CAMPBELL *et al.*, 1996). Su viabilidad, después de cuatro y cinco años en un suelo seco, se puso de manifiesto en dos de los experimentos realizados. La viabilidad de MNSV en las esporas de resistencia de *O. bornovanus*, sospechada por las observaciones epidemiológicas realizadas durante varios años en los invernaderos de la zona y por los resultados obtenidos en otros estudios realizados con anterioridad (GÓMEZ *et al.*, 1993), se puso de manifiesto en algunos de los experimentos planteados. En el primero de los realizados para evaluar el poder patógeno de *O. bornovanus*, algunas de las plantas de melón y pepino resultaron, al inocularse con los aislados Or-201-ss, Or-202-ss2, seropositivas para MNSV (Cuadro 4). En el efectuado para conocer la gama de plantas hospedadoras de *O. bornovanus*, el virus se detectó nuevamente en plantas de melón y pepino con varios de los aislados del hongo (Cuadro 5). Y en los dos realizados con semillas procedentes de plantas libres de MNSV, para estudiar la conservación de *O. bornovanus* y MNSV, ambos se detectaron en muestras de suelo secas durante años. Los resultados obtenidos coinciden con los presentados por algunos investigadores (AVGELIS, 1985; TOMLINSON y THOMAS, 1986) y no

Cuadro 5. Patogenia de aislados monoesporangiales de *O. bornovanus* sobre melón, pepino y sandía y detección de MNSV (Experimento 2).

Aislados	Detección	<i>C. melo</i>	<i>C. sativus</i>	<i>C. lanatus</i>	<i>L. siceraria</i>	<i>C. ficifolia</i>	<i>C. maxima</i>	<i>C. pepo</i>
Or-205-ss	<i>O. born.</i>	++	n.i.	n.i.	+	+++	n.i.	n.i.
(Melón)	MNSV	P	N	P	N	N	N	N
Or-237-ss	<i>O. born.</i>	+++	n.i.	++	+++	+++	++	++
(Melón)	MNSV	P	N	P	N	N	N	N
Or-207-ss	<i>O. born.</i>	+	+++	+	+	++	n.i.	+
(Pepino)	MNSV	P	N	P	N	N	N	N
Or-211-ss	<i>O. born.</i>	+	+++	n.i.	n.i.	+++	n.i.	n.i.
(Pepino)	MNSV	N	N	P	N	N	N	N
Or-225-ss	<i>O. born.</i>	+	n.i.	++	+++	+	n.i.	n.i.
(Sandía)	MNSV	N	N	P	N	N	N	N
Or-239-ss	<i>O. born.</i>	n.i.	n.i.	++	n.i.	n.i.	+++	++++
(Calabacín)	MNSV	P	P	P	N	N	N	N
No inoculados	<i>O. born.</i>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	MNSV	N	N	P	N	N	N	N

Se expresa la infección radicular por *O. bornovanus* (++++= Alta; ++ = Media; + = Baja; n.i.= No infección) y la detección de MNSV (P= Positiva; N=Negativa).

con los obtenidos por otros que sugieren la eliminación del virus en las raíces de las plantas con *O. bornovanus* después de secas durante más de un mes (FURUKI, 1981; CAMPBELL *et al.*, 1991; CAMPBELL y SIM, 1994). La estrecha asociación entre *O. bornovanus* y MNSV se puso de nuevo de manifiesto al comprobarse que los nuevos aislados del hongo obtenidos (Or-201-ssP, Or-202-ss2P y Or-205-ssP) después de 5 inoculaciones sucesivas sobre el cv. de melón Primal (nsv/nsv), fueron todavía portadores de MNSV.

La detección de MNSV, en algunas de las plantas de sandía inoculadas con el aislado Or-234-ss (Cuadro 4), y en todas las del experimento realizado para conocer la gama de plantas hospedadoras de *O. bornovanus* (Cuadro 5), sugieren la transmisión del virus por las semillas comerciales de sandía utilizadas. Hipótesis que deberá ser confirmada en el futuro con otros experimentos diseñados para tal fin. Teniendo en cuenta la conservación de MNSV en *O. bornovanus* durante años, la falta de eficacia de la serología para detectar el MNSV en las semillas

utilizadas de sandía por nosotros y para melón por otros autores (AVGELIS, 1985; CAMPBELL *et al.*, 1996), y el largo espacio de tiempo que transcurre desde que una semilla infectada con MNSV muestra síntomas y resulta seropositiva ó desde que un aislado de *O. bornovanus* portador de MNSV es estado de esporangios de resistencia es capaz de infectar y de transmitir el virus a una planta. Parecería conveniente la revisión de nuevo del tipo de trasmisión por semilla mediada por del vector o por semilla asistida por vector propuesto por otros investigadores (FURUKI, 1981; CAMPBELL *et al.*, 1996).

La especificidad parasitaria dentro de *O. bornovanus*, hallada con anterioridad por otros investigadores (FURUKI, 1981; CAMPBELL y SIM, 1994), se puso también de manifiesto en nuestros experimentos. Las dificultades encontradas por los aislados de melón para infectar a las plantas de pepino y por los aislados de pepino para infectar a las plantas de melón se pudieron medir en las inoculaciones (Cuadro 5) e inoculaciones sucesivas realizadas (Cuadros 4 y 5). Mostrando igualmente que las dos variantes

(melón y pepino) se multiplicaron moderadamente bien sobre sandía. Los resultados obtenidos no sólo demuestran que la multiplicación de los aislados obtenidos de melón es mayor sobre plantas de melón que de pepino y que la multiplicación de los obtenidos de pepino es mayor sobre plantas de pepino que de melón, como ya pusieron de manifiesto los trabajos realizados por CAMPBELL y SIM (1994), sino que indican además, su incapacidad para infectar a las plantas de la especie próxima después de pocas inoculaciones sucesivas.

Los siete aislados monoesporangiales de *O. bornovanus* obtenidos de Almería infectaron sólo a plantas de especies pertenecientes a la familia de las cucurbitáceas, y ninguno de ellos se multiplicó sobre lechuga, coliflor, trébol rojo o cualquier otra especie de las 19 restantes inoculadas. Comportándose por lo tanto, de forma similar a los caracterizados por BARR (1968) y TOMLINSON y THOMAS (1986), identificados por el primero como *Olpidium cucurbitacearum*, más tarde reidentificados como *O. radicale* (LANGE y INSUNZA, 1977) y posteriormente renombrados como *O. bornovanus* (CAMPBELL y SIM, 1994). Ni los dos aislados obtenidos de melón y ni los dos de pepino tuvieron la misma gama de plantas hospedadoras. El aislado de calabacín se multiplicó extraordinariamente bien en ésta misma especie y, en menor medida, en sandía y calabaza (*C. maxima*) y no se multiplicó en melón y pepino como ya le ocurrió a otros investigadores (CAMPBELL y SIM, 1994). El intento de búsqueda de especies de cucurbitáceas que pudieran agrupar las diferentes cepas específicas de *O. bornovanus* no tuvo éxito. Pese a esto, se pone de manifiesto la existencia en Almería de cepas melón, pepino y calabacín de *O. bornovanus* propuestas por los investigadores antes mencionados.

Ocasionalmente, se puso también de manifiesto la capacidad de *O. bornovanus* para transmitir MNSV incluso a especies en las que no fue capaz de producir una detectable infección. El aislado Or-239-ss de cala-

bacín no se detectó en melón, pepino o sandía pero las plantas de las tres especies resultaron seropositivas para MNSV. Estos resultados sugieren que *O. bornovanus* no queda siempre libre de virus, después de dejar secar las raíces infectadas durante un mes, ni tampoco después de multiplicarse en una especie no sensible a MNSV como calabacín (Tabla 6), o en una variedad de melón resistente a MNSV (Cuadro 4).

En el experimento que se realizó para estudiar la gama de plantas hospedadoras para varios aislados monoesporangiales de *O. bornovanus*, en el que se utilizó un lote de semillas de sandía comercial seronegativa para MNSV, se puso de manifiesto la transmisión del virus por las semillas de sandía. La detección de MNSV en todas las plantas de sandía inoculadas con los seis aislados de *O. bornovanus* y en las plantas del testigo parece indicar además una elevada tasa de transmisión. La transmisión del virus por las semillas de melón, con o sin la presencia de *O. bornovanus* y la falta de sensibilidad de la técnica ELISA para detectar en semilla MNSV ha sido citada por varios investigadores (GONZÁLEZ-GARZA *et al.*, 1979; AVGELIS, 1985; CAMPBELL *et al.*, 1996). Futuros trabajos para detectar la contaminación de las semillas deberían ser abordados con idea de evitar el uso de semilla comercial contaminada de MNSV que extendiera la virosis a otras zonas de cultivo. MNSV no se detectó en *C. ficifolia*, *C. maxima*, *C. pepo* ni *L. siceraria* coincidiendo con lo observado otros investigadores (GONZÁLEZ-GARZA *et al.*, 1979; AVGELIS, 1985; TOMLINSON y THOMAS, 1986).

La asociación de *O. bornovanus* con necrosis en el sistema radicular de las plantas de melón, pepino y sandía de los experimentos realizados fue estrecha. Existiendo una relación directa entre número de esporangios y de esporangios de resistencia del hongo y la necrosis radicular observada. Y que coincide con los resultados obtenidos por CAMPBELL y SIM (1994) que observaron una necrosis radicular mayor en las plantas de pepino inoculadas con los aislados de

pepino y en las de melón inoculadas con los aislados de melón.

La dificultad encontrada en ocasiones para detectar *O. bornovanus* en las plantas inoculadas con el hongo y extractos de MNSV, o en ocasiones, en las infectadas con el virus parece indicar una competencia entre el virus y su vector, ya señalada entre *O. bornovanus* y MNSV y entre *O. brassicae* y los virus de la necrosis del pepino (CNV) y de la necrosis del tabaco (TNV) (CAMPBELL *et al.*, 1996).

AGRADECIMIENTOS

A Josefina Ros Orta por su imprescindible trabajo tanto en los experimentos de campo como en los de laboratorio. Al Dr. D. Pivonia por habernos proporcionado dos aislados de *Olpidium bornovanus*. Los estudios se han realizado fundamentalmente con financiación del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, otorgada al proyecto de investigación n° SC00-064-C2-1.

ABSTRACT

GUIRADO, M. L., E. SÁEZ, Y. SERRANO, J. GÓMEZ. 2009. Collection and characterization of isolates single sporangium of *Olpidium bornovanus*. *Bol. San. Veg. Plagas*, **35**: 629-644.

Melon necrotic spot virus (MNSV) has led for years one of the most important diseases in this crop. The virus, which has also been detected in other species of cucurbits such as watermelon and cucumber, is transmitted by the seeds of melon and by *Olpidium bornovanus*, which also seems to be, by itself, pathogen on melon. *O. bornovanus* is a strict parasite and, it is almost always associated with *Olpidium brassicae* on plants of melon, watermelon, cucumber and zucchini, and with MNSV seropositive on melon and watermelon plant. To characterize and evaluate the pathogenicity of different isolates of the fungus was previously necessary to have a collection of isolates originated from a single sporangium and virus free. Once established, we study the influence of various doses of inoculum of the fungus infection on melon plants, the MNSV in the resting spores of *O. bornovanus* conservation and characterized several of them on a wide range of plants belonging to several different botanical families and on plants belonging to the *Cucurbitaceae*. The inoculation with various doses of zoospores was very homogeneous and did not produce a proportional infection of *O. bornovanus* in melon plants. Both *O. bornovanus* as MNSV remained viable in soil samples taken 41 and 65 months earlier. Of all the species inoculated only those belonging to the *Cucurbitaceae* were colonized to a greater or lesser extent by some of the isolates tested in *O. bornovanus*.

Key words clave: Collapse, specificity pathogenic, soil conservation.

REFERENCIAS

- ANÓNIMO. 2008. Anuario de Estadística. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- AVGELIS, A. 1985. Occurrence of melon necrotic spot virus in Crete (Greece). *Phytopath. Z.* **114**: 365-372.
- AVGELIS, A. 1989. Watermelon necrosis caused by a strain of melon necrotic spot virus. *Plant Pathology*, **38**: 618-622.
- BARR, D.J.S. 1968. A new species of *Olpidium* parasitic on cucumber roots. *Can. J. Bot.*, **46**: 1087-1091.
- CAMPBELL, R. 1994. Biological control of soil-borne diseases: some present problems and different approaches. *Crop protection*, **13** (1): 4-13.
- CAMPBELL, R. N., LECOQ, H., WIPF-SCHEIBEL, C., SIM, S. T. 1991. Transmission of cucumber leaf spot virus by *Olpidium radiale*. *Journal of General Virology*, **72**: 3115-3119.
- CAMPBELL, R.N., SIM, S.T. 1994. Host specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (= *Olpidium radiale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Canadian Journal of Botany*, **72**: 1136-1143.
- CAMPBELL, R., WIPF-SCHEIBEL C., LECOQ H. 1996. Vector-assisted seed transmission of melon necrotic spot virus in melon. *Phytopathology*, **86**: 1294-1298.
- CLARK, M. F., ADAMS, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, **34**: 475-483.
- CUADRADO, I.M., GÓMEZ, J., MORENO, P. 1993. El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV) en Almería. I. Importancia del MNSV como causa de la muerte súbita del melón. *Bol. San. Veg. Plagas*, **19** (1): 93-106.

- DIAS H.F. 1970. Transmission of cucumber necrosis virus by *Olpidium cucurbitacearum* Barr & Dias. *Virology*, **40**: 829-839.
- FURUKI, I. 1981. Epidemiological studies on melon necrotic spot. Shizuoka Agr. Exp. Sta, Shizuokaken, Japan. *Tech Bull*, **14**. 94 pp.
- GÓMEZ, J., CUADRADO, I.M., JUAN, E. 1988. Muerte súbita del melón. *Poniente*, **152**: 22-23.
- GÓMEZ, J. 1990. Presencia de *Olpidium brassicae* y *O. radicale* (Phycomycetes, Chytridiales) en Almería. Actas de Horticultura del III Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. 400-406.
- GÓMEZ, J., VELASCO, V. 1991. Presencia de *Olpidium bornovanus* en los embalses para riego en Almería. *Phytoma España*, **33**: 23-27.
- GÓMEZ, J. 1993. Enfermedades del melón en los cultivos "sin suelo" de la provincia de Almería". Comunicación I+D Agroalimentaria 3/93. Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y pesca. 64 pp.
- GÓMEZ, J., CUADRADO, I., VELASCO, V. 1993. El virus de las manchas necróticas del melón en Almería: II. Eficacia de la desinfección del suelo frente al MNSV. 1993. *Bol. San. Veg. Plagas*, **19** (2): 179-186.
- GÓMEZ, J. 2001. Consideraciones sobre la sanidad de los cultivos hortícolas sobre sustratos. V Jornadas de sustratos de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Noviembre 2000. Almería. *Actas de Horticultura*, **32**: 191-207.
- GÓMEZ J., TELLO J. 1997. El control de *Olpidium radicale*, vector del virus del cribado del melón (MNSV), en Almería. En Congresos y Jornadas 44/97. Alternativas al Bromuro de metilo en Agricultura. Obra colectiva coordinada por Bello A., González J.A., Pérez J. y Tello J. Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y pesca. 1997. I.S.B.N.: 84-89802-24-6.
- GONZÁLEZ GARZA, R., GUMPF, D.J., KISHABA, A.N., BOHN, G.W. 1979. Identification, seed transmission, and host range pathogenicity of a California Isolate of Melon Necrotic Spot Virus. *Phytopathology*, **69**: 340-345.
- HIBI, T., FURUKI, I. 1985. Melon Necrotic Spot Virus. *AAB Descriptions of Plant Viruses*, **302**.
- JUAREZ, M., ORTEGA, A., ARMENGOL, J., MARTÍNEZ, G., GARCÍA, J., JORDÁ, C. 1993. Un virus en expansión: el cribado del melón. *Phytoma España*, **45**: 12-17.
- LANGE, L., INSUNZA, V. 1977. Root-inhabiting *Olpidium* species: the *O. radicale* complex. *Transactions British Mycological Society*, **69**: 377-384.
- LIN, M.T., CAMPBELL, R.N., SMITH, P.R., TEMMINK, J.H.M. 1970. Lettuce big-vein virus transmission by single-sporangium isolates of *Olpidium brassicae*. *Phytopathology*, **60**: 1630-1634.
- LUIS, M. 1986. Virosis de cucurbitáceas. I Jornadas Nacionales de cultivos protegidos. Almería, 20 pp.
- LUIS, M. 1994. "Enfermedades producidas por virus". En: Enfermedades de las cucurbitáceas en España. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología nº 1. I.S.B.N.: 84-605-0858-7. (L) Editores J.R. Díaz Ruíz y J. García Jiménez. 73108 pp.
- TOMLINSON, J.A., THOMAS, B.J. 1986. Studies on melon necrotic spot virus disease of cucumber and on the control of the fungus vector (*Olpidium radicale*). *Ann. Appl. Biol.*, **108**: 71-80.

(Recepción: 13 noviembre 2009)

(Aceptación: 23 diciembre 2009)