



Universidad
Politécnica
de Cartagena



**Escuela Técnica Superior
de
Ingeniería Agronómica**



***Grado en Ingeniería Agroalimentaria
y de Sistemas Biológicos***

Caracterización de la microbiota fusárica de
frutos de melón. Estudio de sus relaciones
parasitarias y su control con radiación UVC.

Autor: D. Javier Gómez Bernal

Dirección: D. Juan Antonio Martínez López

Codirección: Dña. María Ángeles Parra Sáez

Cartagena, abril de 2020

Declaración de Honestidad Académica

El alumno D. **Javier Gómez Bernal**, con DNI23300602-S,

como autor del TFE de título **Caracterización de la microbiota fusárica de frutos de melón. Estudio de sus relaciones parasitarias y su control con radiación UVC.**

dirigido por D. **Juan Antonio Martínez López**

para la obtención del título

Grado en Ingeniería Agroalimentaria y de Sistemas Biológicos

Máster Universitario en Ingeniería Agronómica

Máster Universitario en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

DECLARA:

- Que el mencionado TFE es íntegramente de su autoría.
- Que se trata de un trabajo original e inédito en el que no existe plagio.
- Que en todo momento se respeta la propiedad intelectual y en ningún caso se han utilizado como propios resultados ni materiales obtenidos o generados por otros autores.
- Que los resultados y materiales realizados por otros autores han sido debidamente identificados en la memoria.
- Que se ha aplicado al texto íntegro del TFE el control antiplagio que establece la *Normativa de Trabajos Fin de Estudios en la ETSIA*, y acompaña esta declaración de las páginas primera y última del informe obtenido de Turnitin a través de Aul@Virtual.
- Que los directores del TFE conocen y han dado el visto bueno a los resultados del control antiplagio y, en su caso, han informado en la forma que indica el documento *Política de Calidad y Código de Buenas Prácticas*.

Y para que así conste, firma la presente declaración en,

Cartagena, a 16 de abril de 2020

Fdo. **Javier Gómez Bernal**

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría brindar una serie de agradecimientos:

En primer lugar, a mi director Juan Antonio Martínez López, entre otras muchas razones, por descubrirme el mundo de la fitopatología y por ofrecerme la oportunidad de entrar en contacto con empresas y con el mundo laboral externo.

A la Doctora Dina Cifuentes Romo por realizar la secuenciación genética de mis muestras y por ofrecerme la oportunidad (y la responsabilidad) de realizar mis propias PCRs. Aunque estas PCRs no fueron posibles sin la encomiable tutela de Julia Muñoz, que me instruyó pacientemente y gracias a ello salieron unos resultados perfectos.

Al Grupo CFM, Fruca Marketing y su Director de Calidad: Dr. Fulgencio Wadi Aguilar Tarbay, por permitirme colaborar con ellos mediante una beca de colaboración este pasado verano de 2019, además de usar sus instalaciones y sus equipamientos para desarrollar este trabajo.

Y por último a mi familia, y mis padres en especial, por acompañarme en este viaje y por haber soportado más de lo que les correspondía. Nunca podré agradecerles suficientemente todo lo que han hecho por mí.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. El género <i>Fusarium</i> y su morfología.....	3
1.2. <i>Fusarium</i> spp. en melón.....	5
1.3. La radiación ultravioleta como agente biocida	6
1.4. Los efectos de la radiación ultravioleta en melón.....	6
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Materias primas.....	9
3.2. Condiciones de almacenamiento de la materia prima.....	10
3.3. Obtención de aislados de <i>Fusarium</i> spp.....	11
3.4. Selección de los aislados.....	12
3.5. Identificación de especies de <i>Fusarium</i> mediante PCR.....	13
3.6. Estudios de patogenicidad de las especies identificadas.....	14
3.7. Elaboración de fichas técnicas con descripciones morfológicas de cada especie	16
3.8. Preparación de las suspensiones de conidios	16
3.9. Experimentación con radiación UV-C	18
3.10. Conteo de las U.F.C./placa posterior al experimento con UV-C	20
3.11. Estimación de la mortalidad de los conidios irradiados	20
3.12. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos	21
3.13. Supuesto práctico de comparación económica de los distintos tratamientos estudiados	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1. Ejemplo de ficha técnica	23

4.2. Estudios de patogenicidad.....	24
4.3. Experimentación con radiación UV-C	26
5. SUPUESTO PRÁCTICO DE ANÁLISIS ECONÓMICO PARA COMPARAR LOS TRATAMIENTOS	41
6. CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	47
DOCUMENTO: ANEXOS	48
Anexo I: Proceso de PCR.....	49
Anexo II: Fichas técnicas de especies identificadas.....	61
Anexo III: Estudio económico.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Macroconidios de <i>F. oxysporum</i> (A), monofialides y polifialides de <i>F. fujikuroi</i> produciendo microconidios (B) y clamidosporas rugosas terminales de <i>F. brachygibbosum</i> (C).	4
FIGURA 2. Colonias de <i>F. oxysporum</i> y <i>F. proliferatum</i> respectivamente creciendo en Agar PDA.....	4
FIGURA 3. Tanda de muestras de melones Galia (izquierda) y Cantalupo (derecha) de 2018....	9
FIGURA 4. Diferencias entre una podredumbre por <i>Fusarium</i> sp. (A) y una podredumbre mixta (B).	12
FIGURA 5. Cubeta de electroforesis.	13
FIGURA 6. Melones inoculados Cantalupo y Galia (de izquierda a derecha).....	15
FIGURA 7. Detalles del pardeamiento subepicárpico (A, B y C) y el secado de la pulpa en el mesocarpo (B, C y D) ocasionado en melones Cantalupo y Galia por <i>Fusarium</i> spp.	26
FIGURA 8. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de <i>F. brachygibbosum</i>	27
FIGURA 9. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m ²) en <i>F. brachygibbosum</i> . 27	27
FIGURA 10. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de <i>F. chlamydosporum</i>	28
FIGURA 11. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m ²) en <i>F. chlamydosporum</i>	28
FIGURA 12. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de <i>F. equiseti</i>	29

FIGURA 13. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m ²) en <i>F. equiseti</i>	29
FIGURA 14. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de <i>F. fujikuroi</i>	30
FIGURA 15. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m ²) en <i>F. fujikuroi</i>	30
FIGURA 16. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de <i>F. proliferatum</i>	32
FIGURA 17. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m ²) en <i>F. proliferatum</i>	32
FIGURA 18. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de <i>F. solani</i>	33
FIGURA 19. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m ²) en <i>F. solani</i>	33
FIGURA 20. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de <i>A. sclerotigenum – S. strictum</i>	34
FIGURA 21. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m ²) en <i>A. sclerotigenum – S. strictum</i>	34
FIGURA 22. Comparativa de Mortalidad (%) a los 14 días entre las distintas especies.	36
FIGURA 23. Repercusiones de los experimentos con UV-C transcurridos 25 días.	39
FIGURA 24. Sinema de hifas de una colonia de <i>S. strictum – A. sclerotigenum</i> (A) y detalle de microconidios de <i>F. proliferatum</i> (B) y su masificación en <i>F. brachygibbosum</i> (C).	40

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Información de los muestreos	10
TABLA 2. Recuentos de colonias en <i>F. brachygibbosum</i> tras el experimento con UV-C.	27
TABLA 3. Recuentos de colonias en <i>F. chlamyosporum</i> tras el experimento con UV-C.	28
TABLA 4. Recuentos de colonias en <i>F. equiseti</i> tras el experimento con UV-C.	29
TABLA 5. Recuentos de colonias en <i>F. fujikuroi</i> tras el experimento con UV-C.....	30
TABLA 6. Recuentos de colonias en <i>F. longipes</i> tras el experimento con UV-C.	31
TABLA 7. Recuentos de colonias en <i>F. oxysporum</i> tras el experimento con UV-C.	31
TABLA 8. Recuentos de colonias en <i>F. proliferatum</i> tras el experimento con UV-C.	31
TABLA 9. Recuentos de colonias en <i>F. solani</i> tras el experimento con UV-C.....	32
TABLA 10. Recuentos de colonias en <i>A. sclerotigenum – S. strictum</i> tras el experimento con UV-C.....	33

RESUMEN

En este proyecto se llevaron a cabo muestreos de melones var. Galia (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) y var. Cantalupo (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) en la campaña de verano 2018 con el fin de obtener aislados de *Fusarium* spp. e identificarlos morfológica y genéticamente. Con las especies identificadas se realizaron estudios de patogenicidad y experimentos de exposición a radiación UV- C para comprobar qué efectos tuvo esta en la mortalidad de los conidios. Se aislaron e identificaron un total de ocho especies distintas de *Fusarium* (*F. brachygibbosum*, *F. chlamyosporum*, *F. equiseti*, *F. fujikuroi*, *F. longipes*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* y *F. solani*) así como una especie de *Acremonium/Sarocladium*. Los resultados del estudio patogenicidad demostraron que a pesar de que existen diferencias morfológicas notorias entre especies cuando estas se aíslan en medios de cultivo, los síntomas que causan al fruto del melón son similares y no existieron diferencias significativas. A nivel *in vitro*, se pudo observar una clara disminución de U.F.C./placa tras ser irradiadas con UV-C. Se pudo constatar que cuanto mayor fue el tiempo de exposición a la radiación menor fue el desarrollo de las colonias y la cantidad presente de éstas. Para dosis de radiación de 10,5 W/m² y tiempos de exposición de 90 segundos se consiguieron tasas de mortalidad de conidios superiores al 70%. Para la misma dosis, pero exposiciones de 300 segundos, se consiguió aumentar estas tasas de mortalidad por encima del 85%, llegando en algunos casos prácticamente al 100%. Con los datos obtenidos podemos concluir que el tratamiento de radiación ultravioleta C fue bastante efectivo para hacer frente a *Fusarium* y podría ser de gran interés su aplicación como tratamiento físico para reducir las podredumbres en melón.

ABSTRACT

In this work samplings of cv. Galia (*Cucumis melo* var.*reticulatus*) and cv. Cantaloupe (*Cucumis melo* var.*cantalupensis*) melons were carried out in order to obtain *Fusarium* spp. isolates and identify them by using both genetic and morphological tools. With the identified species, pathogenicity studies and exposure to UV-C illumination experiments were conducted to test the effects on conidial inactivation and the development of new colonies. A total of eight different species of *Fusarium* were identified (*F. brachygibbosum*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. fujikuroi*, *F. longipes*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. solani*) as well as a *Acremoium/Sarocladium* species. The results of the pathogenicity studies demonstrated that despite the considerable morphological differences between the species when these were grown in synthetic culture media, the symptoms they caused to the melon fruit were similar and no significant. At a *in vitro* level, it was observed a clear decrease of C.F.U./plate after being exposed to UV-C. It was established that the higher the exposure time to illumination, the lower the development and quantity of colonies. For illumination intensity of 10,5 W/m² and exposure time of 90 seconds, conidial inactivation rates of over 70% were reached. Under the same doses but exposure times of 300 seconds, inactivation rates exceeded values of 85%, reaching, in some cases, almost 100%. With the data obtained we can conclude that the UV-C illumination treatment was very effective against *Fusarium* and its implementation as a physical method to control postharvest diseases of melon could be of high interest.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El género *Fusarium* y su morfología

El género fúngico *Fusarium* es considerado uno de los que mayor grado de diversidad de características ecológicas, fisiológicas y morfológicas posee. La mayoría de sus especies atacan a una amplia variedad de hospedantes y pueden estar presentes en el agua dulce, insectos, otros hongos y en el suelo viviendo como saprófitos. Solamente durante las primeras décadas del desarrollo e investigación en este campo se describieron alrededor 1.000 especies de este género (Zemánková y Lebeda, 2001).

Uno de los aspectos más importantes a la hora de describir e identificar este género, podría basarse, sin duda alguna, en el estudio de sus características morfológicas. La característica general más importante de este género es que las especies pueden producir tres tipos distintos de esporas: microconidios, macroconidios y clamidosporas. Hay especies que incluso pueden producir las tres simultáneamente (Nelson *et al.*, 1994).

Los **macroconidios** (FIGURA 1.A) tienen forma alargada, curvada, como de canoa y son hialinos. Suelen estar septados y se caracterizan por tener un apéndice apical y otro basal con forma de pie (Zemánková y Lebeda, 2001; Leslie y Summerell, 2006). Estos se forman en esporoquios, que son masas de monofialides superficiales que adquieren forma esférica, con apariencia de saco y que a veces pueden estar recubiertos de exudados (Nelson *et al.*, 1994).

Los **microconidios** (FIGURA 1.B) son mucho más pequeños que los macroconidios. Poseen una amplia gama de formas, no están septados y, al igual que estos últimos, son hialinos. Se forman en cadenas tanto en monofialides como en polifialides. (Leslie y Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1994).

En ocasiones, aparecen conidios de un tamaño y forma intermedios, subdesarrollados. Se les suele nombrar **mesoconidios**, aunque por afinidad en morfología se suelen considerar como macroconidios.

Las **clamidosporas** (FIGURA 1.C) pueden aparecer intercaladas dentro de una hifa o en sus extremos apicales, tanto en solitario como en cadenas y racimos. Por

último, aunque menos frecuente, también pueden aparecer esclerocios y estromas (Gómez, 2008).



FIGURA 1. Macroconidios de *F. oxysporum* (A), monofiálides y polifiálides de *F. fujikuroi* produciendo microconidios (B) y clamidosporas rugosas terminales de *F. brachygibbosum* (C).

Fuente: elaboración propia (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena)

Otra característica morfológica muy importante, aunque se considera un carácter secundario, es el desarrollo y crecimiento de las colonias. Estas son de rápido crecimiento y color pálido o blanco en los frutos, aunque no es extraño que pueda aparecer alguna colonia pigmentada. Sin embargo, al aislar y cultivar especies de este género de hongos en medios de cultivo es muy frecuente que se desarrollen marcadas y vistosas tonalidades que pueden variar desde colores amarillos, carmín, violeta, púrpura u ocre (FIGURA 2). Este hecho está muy relacionado con el pH del medio de cultivo empleado y con las condiciones de cultivo (Leslie y Summerell, 2006).

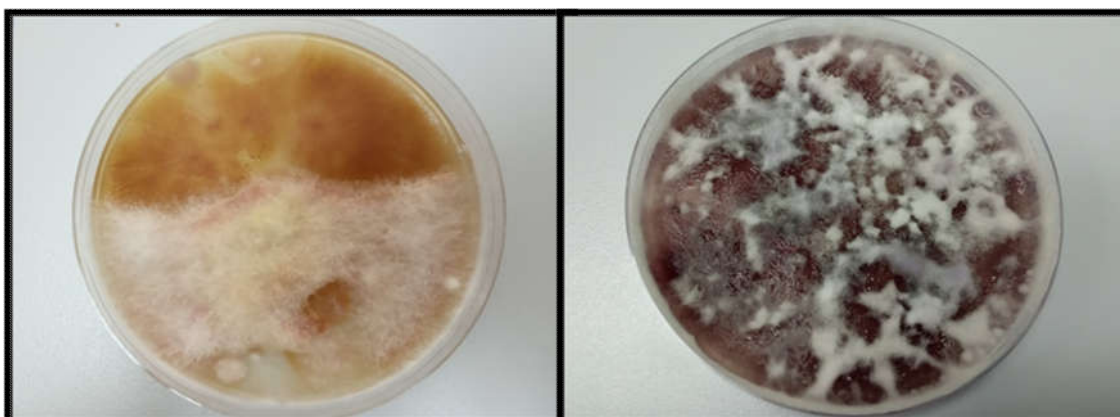


FIGURA 2. Colonias de *F. oxysporum* y *F. proliferatum* respectivamente creciendo en Agar PDA.

Fuente: elaboración propia (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena)

1.2. *Fusarium* spp. en melón

Como se menciona en el apartado anterior, el género *Fusarium* ataca a una amplia variedad de hospedantes, que incluyen plantas, insectos, animales domésticos e incluso personas (Zemánková y Lebeda, 2001; Leslie y Summerell, 2006). Dentro del género hay hongos fitopatógenos que atacan a plantas de la familia de las cucurbitáceas, a la que pertenece el melón (*Cucumis melo* L.), que será un pilar importante en el estudio desarrollado a lo largo este trabajo.

En el caso del melón, dentro de las especies que aparecen citadas y descritas con más frecuencia como causantes de enfermedad, se encuentran *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* y *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* (Bernhardt *et al.*, 1988; Blancard *et al.*, 1992; Vázquez y Tello, 2000; Zitter *et al.*, 2004).

Para *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* se menciona que la podredumbre de raíces y tallos causadas por esta especie puede llegar a transmitirse a los frutos, especialmente la raza 2, si bien la raza 1 también ataca a los frutos además de las raíces y tallos. (Bernhardt *et al.*, 1988).

A *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* se le describe como principal causante de la fusariosis del melón, con síntomas como el amarilleamiento foliar, podredumbre del hipocótilo y “damping-off” en plántulas jóvenes. Pueden producirse también manchas cloróticas en la corona que pueden expandirse tallo arriba hasta 25-50 cm produciendo exudados gomosos. En tejidos muertos puede aparecer profusamente produciendo manchas miceliales blancas con elevada presencia de macroconidios. No se hace mención sin embargo a los daños causados en el fruto (Zitter *et al.*, 1988). A todo este conjunto de síntomas ocasionados por esta especie de *Fusarium* se le conoce como el marchitamiento fusárico del melón o MFW de sus siglas en inglés “Melon Fusarium Wilt” y está considerada como una de las enfermedades más destructivas del melón (Oumouloud *et al.*, 2013).

Parece difícil encontrar referencias de otras especies de *Fusarium* descritas como patógenos del fruto de melón exceptuando estas dos. Si bien, existen ensayos que demuestran que se pueden aislar otras especies de los tejidos del tallo del fruto y de la rizosfera tales como *F. commune*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. delphinoides* o *F. andiyazi* (Seo y Ho Kim, 2017). En el presente trabajo trataremos averiguar si también

se pueden aislar otras especies distintas a *F. oxysporum* y *F. solani* exclusivamente de frutos de melón.

1.3. La radiación ultravioleta como agente biocida

Las frutas y hortalizas frescas son muy vulnerables a la acción de microorganismos. Esto puede evitarse, o al menos posponerse, con la aplicación de tratamientos superficiales siempre y cuando estos sean lo suficientemente cuidadosos. Es por ello por lo que surgen técnicas de control físico de microorganismos como los tratamientos de luz ultravioleta (Turtoi, 2013).

En los experimentos llevados por Rotem *et al.*, en 1984, se estudiaron las tasas de germinación de unos microorganismos (*Alternaria solani*, *Uromyces phaseoli* y *Peronospora tabacina*) en distintos escenarios: exposición directa a la luz del sol y exposición indirecta a la luz protegidos por un filtro de luz ultravioleta o por una hoja de tabaco. Para el caso de *A. solani* y *U. phaseoli* se consiguieron tasas de germinación de entre el 100-95% para las muestras que estaban cubiertas por el filtro anti-radiación y del 95 – 90% para las que estaban cubiertas por hoja de tabaco (respectivamente). Sin embargo, para las muestras expuesta a la luz del sol directa, y por lo tanto a radiación ultravioleta, la germinación se redujo hasta niveles del 78 y 35% respectivamente.

Turtoi, (2013), hace una recopilación mucho más exhaustiva de las conclusiones obtenidas por otros autores acerca de la aptitud biocida de la radiación ultravioleta, tanto en experiencias *in vitro* como *in vivo* de determinadas cultivares de melones, cítricos, pimiento, uva, frutas de hueso e incluso de algunas frutas tropicales como el mango o la piña. Por norma general, los tratamientos con UV-C previos al almacenamiento de los frutos proporcionaron resultados positivos y efectivos en términos de reducción de la aparición de enfermedades poscosecha.

1.4. Los efectos de la radiación ultravioleta en melón

La mayoría de los estudios concernientes a la relación entre el melón y la radiación ultravioleta han sido llevados a cabo en frutos procesados, ya sean cortados en rodajas o piezas pequeñas (Laminkara *et al.*, 2002; Laminkara *et al.*, 2005; Turtoi, 2013; Kasim y Ufuk, 2014;).

En el caso de los melones procesados y expuestos a luz ultravioleta, la producción de ésteres alifáticos se redujo en un 60% más que en el fruto fresco

procesado sin recibir ningún tratamiento (Laminkara *et al.*, 2002;Turtoi, 2013). En cambio, los frutos procesados bajo radiación ultravioleta-C mostraron el nivel más bajo de esterasas durante su periodo de almacenamiento. La actividad de lipasas sin embargo fue mayor en frutos cortados posteriormente a recibir la radiación UV-C que aquellos que fueron procesados directamente bajo la radiación. Se demostró además la efectividad de dicha radiación sobre hongos filamentosos, levaduras y algunas bacterias (Laminkara *et al.*, 2005;Turtoi, 2013).

Kasim y Ufuk (2014) llevaron a cabo una serie de experimentos con melón cantalupo sometiendo los frutos procesados a una dosis de radiación UV-C constante, pero durante distintos tiempos de exposición. Los resultados obtenidos fueron, entre otros, que la acumulación de sólidos solubles durante el almacenamiento posterior al tratamiento aumentaba paulatinamente con la prolongación del tiempo de exposición a la radiación. Sin embargo, con el tratamiento control y con el tratamiento de mayor duración de exposición a UV-C, los sólidos solubles totales disminuyeron. En cuanto a la pérdida de peso del fruto durante el almacenamiento, las diferencias entre tratamientos y entre estos y el control fueron estadísticamente irrelevantes. Por ello los autores remarcan que no parece existir una relación causal directa entre este fenómeno y la exposición a radiación UV-C.

2. OBJETIVOS

El primer objetivo de este trabajo es la caracterización de la microbiota fusárica de melón Galia y Cantalupo, tanto a nivel morfológico como a nivel genético. Esto nos permitirá conocer con exactitud las especies de *Fusarium* aisladas de este fruto que son capaces de producir podredumbre y algunos aspectos importantes concernientes a sus estructuras reproductivas y caracteres morfológicos secundarios para poder elaborar un método que permita su fácil identificación.

El segundo objetivo consistirá en estudiar la patogenicidad de las especies identificadas para poner de manifiesto sus relaciones parasitarias con el fruto del melón y los daños que causan a éste.

El tercer y último objetivo consistirá en establecer el efecto de la radiación ultravioleta-C sobre las esporas de los aislados identificados. Con los resultados de este experimento se pretende observar los efectos que tiene la radiación UV-C sobre la tasa de mortalidad/inactivación de los conidios de *Fusarium* spp. y, por tanto, hacer una estimación de su viabilidad como posible método biocida de control de las podredumbres fusáricas de frutos de melón.

Se planteará, además, un supuesto práctico para comparar y analizar la rentabilidad económica de la implantación de distintos tratamientos de UV-C en una línea de procesado de melón.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materias primas

Para obtener los aislados necesarios para el estudio objetivo de este trabajo, se llevaron a cabo una serie de muestreos semanales (FIGURA 3) de melones de las variedades Cantalupo y Galia. Dichos muestreos se llevaron a cabo durante la campaña de verano de 2018 (julio, agosto y primera quincena de septiembre) en los almacenes de la empresa Fruca Marketing S.L., del Grupo CFM. Se tomaban muestras de frutos sanos de cosecha reciente del almacén y se trasladaban al laboratorio de Fitopatología de la UPCT.

Además, en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la UPCT existían ya algunos aislados de *Fusarium* spp., almacenados en la colección de microorganismos del grupo de fitopatología de la UPCT denominada MAPYS (Microorganismos de la Agricultura, Poscosecha y Sostenibilidad), asociada a la Red de Microorganismos Españoles (REDESMI). Estos aislados fueron obtenidos de melones de las mismas variedades y el mismo proveedor, pero de las campañas de los veranos de 2015 y 2017. La procedencia de los melones es la Región de Murcia en su práctica totalidad (y un porcentaje menor de Castilla La-Mancha).



FIGURA 3. Tanda de muestras de melones Galia (izquierda) y Cantalupo (derecha) de 2018.

Fuente: elaboración propia

En la TABLA 1 se detalla más información (como por ejemplo la finca de procedencia, la cantidad y variedad de cada melón o la fecha de realización del muestreo) acerca de los muestreos llevados a cabo en 2018.

TABLA 1. Información de los muestreos

Muestra	Fecha muestreo	Melones	Finca procedencia
1	18/06/2018	6 x Galia 6 x Cantalupo	Huertas San Isidro Agro La Guía
2	25/06/2018	12 x Galia	Huertas San Isidro
3	02/07/2018	10 x Cantalupo	Leandro Pedroño
4	11/07/2018	12 x Galia	Los Almendros
5	17/07/2018	12 x Galia 6 x Cantalupo	La Hortichuela Huertas San Isidro
6	26/07/2018	12 x Cantalupo	La Forja
7	01/08/2018	12 x Galia	Huertas San Isidro
8	21/08/2018	6 x Galia 6 x Cantalupo	José Muñoz Manjavacas Jesús Molina
		Σ	100 melones (60 Galia y 40 Cantalupo)

3.2. Condiciones de almacenamiento de la materia prima

Los melones muestreados se guardaron en cajas de cartón grandes y se almacenaron en condiciones de temperatura ambiente y a la sombra en el laboratorio, sin cubrir. Se separaron por un lado los frutos de la variedad Cantalupo y por otro lado los Galia. La temperatura media mensual en el laboratorio fue de 25,6°C durante julio, 26°C en agosto y 24°C en septiembre. Se llegaron a alcanzar valores entre el 42,1 y el 50,6% de humedad relativa.

De manera natural y con el paso de los días, los frutos comenzaron a enfermar por especies fúngicas diversas, incluidas especies de *Fusarium*, cuyos propágulos emergía por la corteza y áreas de escriturado de los melones. En el caso de que transcurridos siete días no hubiesen proliferado hongos en alguna de las cajas, estas eran sometidas a condiciones forzadas de almacenamiento. Dichas condiciones consistían en envolver las cajas con una bolsa e introducir un pequeño recipiente abierto con agua (un vaso o matraz pequeño, por ejemplo) en su interior. Con esto se logra que la temperatura y la humedad relativa interna dentro de la caja se dispare (alcanzando

valores de temperatura de hasta 30,7 °C y 80% de HR), acelerando el proceso de pudrición de los melones y el desarrollo fúngico.

Como norma general, los frutos permanecieron una semana en las cajas en condiciones de almacenamiento normales, y un máximo de dos semanas extra en condiciones forzadas. Si transcurridos este periodo de tiempo en los melones no se había desarrollado ninguna colonia de *Fusarium*, estos eran descartados. Se estudiaban aproximadamente una docena de frutos a la semana.

3.3. Obtención de aislados de *Fusarium* spp.

El aislamiento de los patógenos se realizó a partir de los frutos almacenados con micelio fúngico identificado como *Fusarium*, a partir de áreas separadas de otros micelios que correspondían a otros patógenos en el caso de que se tratase de podredumbres mixtas (FIGURA 4).

Los aislados se obtuvieron separando cuidadosamente un fragmento de micelio usando una lanceta o unas pinzas flameadas con alcohol y un mechero bunsen. Se evitó arrastrar corteza o pulpa del melón puesto que puede ser un foco de contaminación. El fragmento de micelio se depositó en una placa Petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo Agar de Patata y Dextrosa (PDA – Scharlab[®], Barcelona) y se selló con parafilm. Estas placas eran rotuladas debidamente y se almacenaban a temperatura ambiente en el laboratorio, en condiciones de día y noche, hasta que las colonias de *Fusarium* se desarrollaban y ocupaban al menos 2/3 de la superficie de la placa. Una vez alcanzado ese tamaño, se guardaban en refrigeración para ralentizar el crecimiento excesivo de la/s colonia/s, y por lo tanto la degradación del aislado por falta de nutrientes.

En la etapa siguiente, se procedía a purificar cada uno de los aislados mediante una siembra en PDA realizada a partir del borde de cada colonia por separado.

En el caso de que las colonias creciesen con contaminación bacteriana, se realizaban subcultivos en PDA con antibióticos como estreptomycinina o ampicilina (0,1 g/L). Se recomienda tener al menos 2 o 3 repicados de cada aislado por motivos de seguridad almacenados en refrigeración.

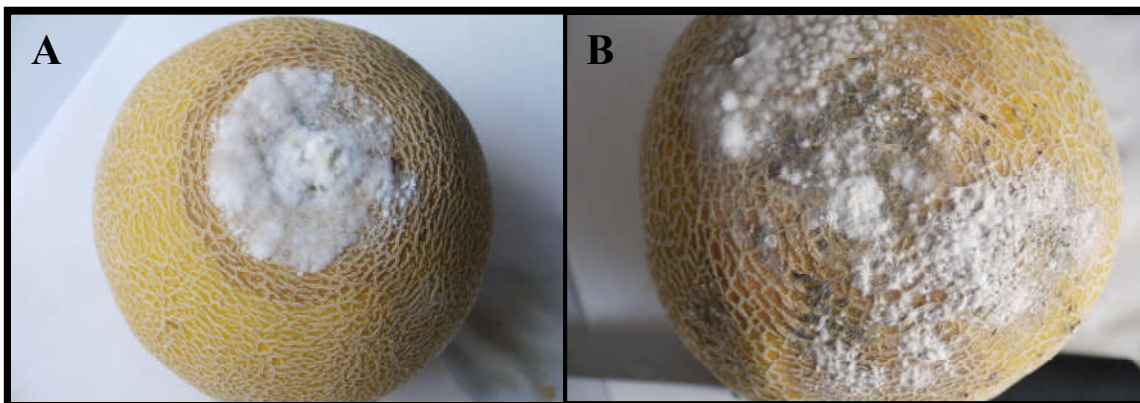


FIGURA 4. Diferencias entre una podredumbre por *Fusarium* sp. (A) y una podredumbre mixta (B).

Fuente: elaboración propia (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena)

3.4. Selección de los aislados

Para poder identificar nuestros aislados por técnicas moleculares, primero se tuvo que seleccionar cuántos se enviarían a secuenciar genéticamente. Para ello, se realizaron observaciones en el microscopio para intentar buscar algún carácter morfológico primario que pudiera diferenciar los distintos aislados entre sí y clasificarlos en diferentes morfotipos que engloban a aislados por sus características fenotípicas.

En este caso, la gran mayoría de aislados que se obtuvieron presentaban características muy similares, siendo la más diferenciadora la ausencia de clamidosporas y/o macroconidios completamente formados en algunos de ellos. Como las condiciones y los medios de cultivo fueron los mismos para todos los aislados (temperatura ambiente del laboratorio y ciclo naturales de luz/oscuridad) se decidió también diferenciar unos aislados de otros por características secundarias como la pigmentación de las colonias y/o el tipo de micelio aéreo producido.

Todas estas medidas se tomaron para evitar en la medida de lo posible enviar varias muestras de una misma especie de *Fusarium* a secuenciar pero, como veremos en el apartado 4 de este documento, algunas especies estuvieron presentes múltiples veces en los resultados de secuenciación e identificación. El total definitivo de muestras seleccionadas para ser enviadas a identificar ascendió a 19.

3.5. Identificación de especies de *Fusarium* mediante PCR

Los 19 aislados seleccionados fueron llevados a los laboratorios del IBV (Instituto de Biotecnología Vegetal) para ser identificados. Se les practicó una amplificación de su secuencia genética por medio de una PCR (Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa) siguiendo los protocolos y las instrucciones allí establecidos.

Para ello, primero se llevó a cabo una extracción de ADN a cada muestra siguiendo el protocolo de Raeder & Broda (Raeder y Broda, 1985), pero con algunas modificaciones mínimas en las concentraciones de alguno de sus reactivos.

Una vez extraído el ADN se midió su concentración mediante un fluorímetro/espectrofotómetro Nanodrop 2.000 conectado a un ordenador con un driver/controlador para tomar las mediciones y, en función de los valores obtenidos, se ajustó la concentración de material genético de cada muestra con agua destilada estéril hasta alcanzar un valor de 100 ng/μL de ADN.

Con las muestras debidamente ajustadas a la concentración deseada, se cargaron en un gel de amplificación en una cubeta/cámara de electroforesis (FIGURA 5) para estudiar la calidad de éste, respecto a una muestra testigo. El gel amplificado se visualizó en una cámara transiluminadora de luz infrarroja conectada a un ordenador con el software VisionCapt. Las muestras que amplificaron anómalamente o mostraron algún indicio de poder haber arrastrado algún tipo de contaminación repitieron el proceso.

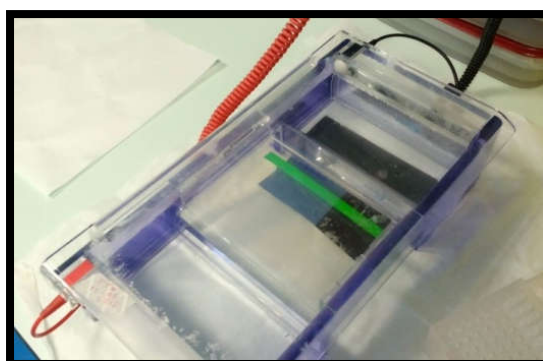


FIGURA 5. Cubeta de electroforesis.

Fuente: elaboración propia (Fotografía obtenidas en los laboratorios del Instituto de Biotecnología Vegetal de la UPCT)

A continuación, se preparó una mezcla maestra o MIX de PCR, la cual se combinó con el material genético en unas proporciones determinadas y durante una serie de ciclos térmicos, en un termociclador (Biorad). Inmediatamente a posteriori se volvió a cargar otro gel de amplificación para visualizar las muestras mediante VisionCapt. Aquellas que pasaban exitosamente la segunda prueba de amplificación eran purificadas para definitivamente, ser enviadas a cotejar a un banco de ADN y luego secuenciar su estructura genética.

Las secuenciacines genéticas fueron realizadas por la Doctora Dina Cifuentes Romo, la cual empleó el software Mega Versión 6 (Tamura *et al.*, 2013). Este software dirige al NCBI (National Center for Biotechnology Information) para que mediante el programa BLAST se puedan identificar las secuencias. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema con una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos. En este caso, se estudió la región ITS del ADN ribosómico de las muestras.

Esta es una descripción pormenorizada del proceso. La explicación más detallada y en profundidad de éste, de todos y cada uno de los reactivos, sus proporciones y los equipos empleados se encuentra en el documento **Anexo 1: Proceso de PCR**.

3.6. Estudios de patogenicidad de las especies identificadas

Conociendo las distintas especies de *Fusarium* existentes entre nuestros aislados secuenciados, se procedió a realizar las inoculaciones en frutos para estudiar la patogenicidad de éstas y sus relaciones parasitarias con el fruto. Como hospedante en este ensayo se emplearon melones Cantalupo y Galia sanos, recolectados lo más recientemente posible. El origen de estos melones es exactamente el mismo que el de los empleados para obtener los aislados de *Fusarium*. Fueron todos melones de las cosechas tardías (en el caso de la Región de Murcia) de primeros de septiembre. El experimento fue llevado a cabo en un fruto por cada especie identificada tal y como se describe a continuación.

Se eligieron estratégicamente 4 puntos en la superficie de un melón (situados en polos opuestos y en el ecuador del fruto) los cuales fueron desinfectados con alcohol. En la zona desinfectada se trazó un círculo de unos 2 cm de diámetro con rotulador

permanente. Con un bisturí flameado con alcohol y mechero se practicó una incisión de unos 5 mm de longitud aproximadamente en el centro del círculo. Dicha incisión se practicó de un solo trazo de tal manera que apenas rasgase la corteza del melón, profundizando 1 o 2 mm como máximo.

Con otro bisturí flameado se cortó un fragmento de agar cuadrado con micelio de una de las placas de la especie deseada. Con unas pinzas flameadas se depositó el trozo recortado sobre la incisión, de modo que el micelio entrara en contacto directo con el corte. El fragmento de agar se cubrió con cinta adhesiva para asegurar que se mantuviese adherido a la superficie del fruto. Este proceso se llevó a cabo en cada uno de los cuatro puntos elegidos de cada melón para una sola especie de *Fusarium*.

El experimento se repitió tantas veces como especies identificadas se tenían. Las especies aisladas de *Galia* se inocularon en melones del mismo grupo, de igual manera se procedió con las especies de Cantalupo. (FIGURA 6).



FIGURA 6. Melones inoculados Cantalupo y *Galia* (de izquierda a derecha).

Fuente: elaboración propia (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena).

Los melones inoculados permanecieron a temperatura ambiente (unos 24°C) en el laboratorio, en bandejas de plástico sin cubrir, y se revisaron con frecuencia una vez empezó a evolucionar el micelio en los puntos de inoculación. Se tomaron fotografías de dicho progreso y una vez se consideró el desarrollo micelial suficiente, se procedió a examinar cómo se desarrolló el hongo en el interior del fruto y los daños causados (tanto internos como externos). Por desarrollo micelial suficiente se consideró que en al menos 3 de los 4 puntos de inoculación de un melón, el círculo trazado con rotulador hubiese sido completamente cubierto con micelio.

Para examinar los efectos ocasionados en el fruto por el parasitismo del hongo, se practicaron incisiones con un cuchillo en los puntos de inoculación y se extrajeron secciones del melón. Se fotografiaron, describieron y anotaron los efectos observados con la mayor precisión posible.

3.7. Elaboración de fichas técnicas con descripciones morfológicas de cada especie

Con las mismas especies de *Fusarium* con las que se llevaron a cabo los estudios de patogenicidad se elaboraron unas fichas descriptivas. En estas fichas se recogió de una manera breve y simple, pero a la vez concisa, las características morfológicas más destacables.

Para elaborarlas, se examinaron en el microscopio colonias de todas las especies identificadas. Con una lanceta flameada con alcohol y un mechero se fueron tomando muestras de cada hongo, se depositaron en un portaobjetos con un poco de agua y se visualizan en el microscopio. Las siguientes características fueron descritas y anotadas:

- Color y tipo de micelio aéreo.
- Presencia de esporodoquios o exudados.
- Presencia (o no) de microconidios, macroconidios y/o clamidosporas.
- Morfología de estos/as y tamaño.

Con toda esta información se elaboró un prototipo de ficha, del cual se puede ver un ejemplo en el apartado 4.1 de este documento. Estas fichas pueden ser de gran utilidad como un acompañamiento extra al informe de la secuenciación genética puesto que aportan una información adicional acerca del desarrollo de cada especie para unas condiciones determinadas (en este caso temperatura ambiente de unos 23-24°C, condiciones de luz / oscuridad y medio de cultivo Agar PDA hasta que la superficie del medio de cultivo se cubra por completo con el hongo. Luego las placas se conservaron en refrigeración a unos 4-6°C). Las fichas de todas y cada una de las especies se entregarán adjuntas en el documento **Anexo II: Fichas técnicas de especies identificadas**.

3.8. Preparación de las suspensiones de conidios

Para poder realizar el experimento *in vitro* con radiación UV-C de las especies identificadas se tuvieron que preparar suspensiones de conidios de cada una de ellas. El

método elegido para preparar dichas suspensiones es el descrito por D. Newmeyer (Newmeyer, 1990).

Este procedimiento consiste en tomar unas pipetas de vidrio de 1-10 mL y colocar un tapón de algodón en la apertura más ancha de la pipeta (normalmente el extremo por el que se haría succión con la propipeta) de modo que este acabase en una especie de mecha. El tapón de algodón actúa de filtro. Se preparó, siguiendo este método, una pipeta por cada especie. Las pipetas con sus filtros improvisados de algodón se esterilizaron en el autoclave envueltas en papel de aluminio.

Llegado el momento de obtener las suspensiones de conidios, se vertió con una pipeta aproximadamente 15 mL de agua destilada estéril sobre cada una de las placas de los hongos. Se dejó reposar aproximadamente 2-3 minutos cada placa para dejar que el micelio de las colonias entrase en contacto con el agua. A continuación, se aplastó suavemente con una lanceta flameada con alcohol y mechero la superficie de las colonias (pero con mucho cuidado de no desprender fragmentos del agar).

Seguidamente se colocó una propipeta en la apertura más estrecha (normalmente el extremo que estaría en contacto con el fluido a pipetear) de una de nuestras pipetas esterilizadas con filtro de algodón. Se puso la mecha del filtro en contacto con la suspensión de agua destilada estéril, conidios y fragmentos de hifas de la placa pertinente. Haciendo succión con la propipeta, se forzó a la suspensión a pasar a través del filtro de algodón. Los fragmentos de hifas, restos del medio de cultivo y otras impurezas quedaron atrapados en las fibras del algodón. Por el contrario, los conidios pasaron sin ningún problema a través del filtro debido a su menor tamaño.

Finalmente, con mucho cuidado, se retiró el filtro de algodón con unas pinzas y se vaciaba el contenido de la pipeta sobre un recipiente de cierre aislante. Este se sellaba y rotulaba debidamente al instante. El filtro de algodón y la pipeta eran descartados. El proceso se repitió para cada una de las especies identificadas, siempre dentro de la cabina de flujo horizontal para asegurar la máxima asepsia del proceso. Los recipientes con las suspensiones de conidios se guardaron en refrigeración a unos 4-6°C en el frigorífico.

Al día siguiente de preparar las suspensiones, se hizo un recuento de la concentración de conidios de cada una de ellas mediante una cámara de recuento

Thoma. Como las concentraciones fueron muy altas, se ajustaron a unos 3.000 conidios/mL, aproximadamente, para poder garantizar en un conteo viable de U.F.C. en las placas sembradas con estas suspensiones.

3.9. Experimentación con radiación UV-C

Para estudiar el impacto del incremento del tiempo de exposición frente a ultravioleta de las especies de *Fusarium* identificadas se planteó el siguiente experimento. Se propusieron cuatro tratamientos distintos y un control para cada uno de los hongos:

- **Control:** 0 segundos de exposición a $10,5 \text{ W/m}^2$ de intensidad de UV-C
- **Tratamiento 1:** 10 segundos de exposición a $10,5 \text{ W/m}^2$ de intensidad de UV-C
- **Tratamiento 2:** 30 segundos de exposición a $10,5 \text{ W/m}^2$ de intensidad de UV-C
- **Tratamiento 3:** 90 segundos de exposición a $10,5 \text{ W/m}^2$ de intensidad de UV-C
- **Tratamiento 4:** 300 segundos de exposición a $10,5 \text{ W/m}^2$ de intensidad de UV-C

Se hicieron 4 repeticiones de cada tratamiento y control. El experimento se llevó a cabo el 14 de agosto de 2019. Ese mismo día se rotularon 20 placas Petri de 6 cm de diámetro (5 tratamientos x 4 repeticiones/tratamiento) vacías, sin medio de cultivo. Dentro de la cabina de flujo laminar, se pipetearon 300 μL de suspensión de conidios y se depositaron en cada una de las 20 placas. Este proceso se repitió para cada especie. Las placas, sin sellar, se colocaron en bolsas agrupadas acorde al tratamiento que se les hubiese asignado y estas bolsas en bandejas de plástico.

Las 180 placas (20 placas/especie x 9 especies identificadas) fueron llevadas a las instalaciones de la empresa Fruca Marketing en Balsapintada. En una de las líneas de procesamiento de pimientos con las que cuenta la empresa hay un equipo de radiación UV-C. Este equipo consiste en una gran carcasa metálica con varias lámparas de luz ultravioleta en su interior que envuelve una cinta transportadora por la que circulan los frutos. Los extremos de entrada y salida de la cinta están cubiertos por unas cortinas flecadas de PCV flexible y opaco.

Se colocaron las placas en unas bandejas de cartón en función del tratamiento que se les hubiese asignado, e inmediatamente antes de ser irradiadas se les retiró la tapa a todas (para evitar que esta redujese la efectividad del UV-C). Cada bandeja

permaneció expuesta el tiempo correspondiente al tratamiento de las placas que contuviese. Una vez transcurrido este tiempo, las bandejas eran sacadas y las placas tapadas de nuevo para volver a ser introducidas en las bolsas de autoclave y estas en las bandejas de plástico. Este procedimiento se repitió para cada uno de los tratamientos. Aunque las placas correspondientes al control no fueron irradiadas, también se colocaron en una bandeja de cartón (aunque no se abrieron las tapas de estas en ningún momento) para que las condiciones ambientales fuesen las mismas. Una vez concluidos todos los procedimientos, las muestras fueron transportadas de vuelta al laboratorio. El tiempo para efectuar el recorrido de ida y vuelta fue de 45-50 minutos y el experimento duró en total unos 20 minutos.

La intensidad media de radiación obtenida en el equipo de ultravioleta, EXTECH Instruments, modelo SDL470, fue de $10,5 \text{ W/m}^2$. Ésta se mantuvo constante durante todo el tiempo de exposición. Si tenemos en cuenta que $1 \text{ W/m}^2 \times 1 \text{ s} = 0,01 \text{ J/s} \times \text{m}^2 \times 1 \text{ s} = 0,01 \text{ J/m}^2$, las dosis recibidas por cada placa expresadas en kJ/m^2 , en cada tratamiento fueron las siguientes:

- **Control:** 0 kJ/m^2
- **Tratamiento 1:** $1,05 \text{ kJ/m}^2$
- **Tratamiento 2:** $3,15 \text{ kJ/m}^2$
- **Tratamiento 3:** $9,45 \text{ kJ/m}^2$
- **Tratamiento 4:** $31,50 \text{ kJ/m}^2$

La dosis comercial que se utiliza para el tratamiento de pimientos y melones varía entre 4 a 10 kJ/m^2 .

De vuelta en el laboratorio, las suspensiones de conidios irradiadas y las de los controles fueron sembradas en superficie. Las siembras se realizaron en la cabina de flujo laminar y por duplicado en placas Petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo Agar PDA + estreptomina (para evitar posibles contaminaciones por bacterias, preparadas uno o dos días antes del experimento).

Usando una pipeta se repartió el contenido de cada una de las placas Petri tratadas con UV-C en 2 placas Petri de 9 cm, pipeteando $150 \mu\text{L}$ en cada una. Usando asas de siembra estériles y desechables, se repartió bien la suspensión de conidios por toda la superficie de la placa. Las placas sembradas se rotularon y colocaron en unas

bandejas de plástico agrupadas en ‘torre’ según el tratamiento recibido. Las placas se dejaron a temperatura ambiente (26°C) y en condiciones día/noche. El total de placas existentes en este punto del trabajo ascienden a 360 (9 especies identificadas x 5 tratamientos/especie x 4 placas/tratamiento x 2 duplicados por placa).

Se efectuó un seguimiento diario de las placas. Este seguimiento consistió de un conteo de U.F.C. en cada una de las 360 placas durante los 14 días posteriores a la siembra de éstas. Se tomaron algunas fotografías del proceso. Pasado este tiempo, se hicieron observaciones al microscopio de algunas de las colonias de placas de los tratamientos 3 y 4. Posteriormente, todas las placas fueron descartadas y se dieron por finalizados todos los experimentos de este trabajo. Se guardaron en glicerol muestras de cada una de las especies sin irradiar para conservarlas en MAPYS.

3.10. Conteo de las U.F.C./placa posterior al experimento con UV-C

El conteo se realizó los primeros días empleando una lupa de recuento de colonias y se continuó diariamente durante 14 días para estudiar también el efecto fungistático de la radiación, no sólo el efecto fungicida. Para ello, se iban marcando las colonias de *Fusarium* contabilizadas con un rotulador permanente. Una vez transcurridos los primeros 3 o 4 días, como el crecimiento de colonias se estabilizó, el conteo se efectuó a simple vista. Los resultados obtenidos se iban anotando en una hoja de cálculo. Las placas en las que aparecía mucha contaminación se sellaban con parafilm. Durante este tiempo las placas seguían permaneciendo en las mismas condiciones de temperatura ambiente de 26°C y exposición día/noche.

3.11. Estimación de la mortalidad de los conidios irradiados

Para calcular la mortalidad acaecida en las distintas especies según el tratamiento recibido se planteó una simple ecuación.

Se decidió asignar al máximo desarrollo (U.F.C./placa) medio en las placas control (una vez finalizado el experimento) como el 100% de viabilidad de conidios en condiciones ideales. Por tanto, la mortalidad para estas placas control sería del 0%. En cambio, en las placas de los demás tratamientos la mortalidad se calculó como:

$$\text{Mortalidad (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{N}^\circ \text{ U.F.C./placa} * \text{día} * \text{tratamiento}}{\text{N}^\circ \text{ U.F.C./placa} * \text{día} * \text{control}} \times 100 \right) \quad (\text{ECUACIÓN 1})$$

En la Ecuación 1, el término entre paréntesis representa la supervivencia (en %) de una placa de un tratamiento determinado para un día cualquiera. Como U.F.C. / placa máximo del control se tomó el promedio de los valores máximos de las 8 placas control tras los 14 días de cada una de las especies de *Fusarium*. Se aplicó la ECUACIÓN 1 para cada día y cada una de las placas de los distintos tratamientos. Los resultados obtenidos se promediaron.

3.12. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos

Se realizaron una serie de análisis estadísticos básicos. Se calcularon valores medios y la desviación estándar de:

- Los valores diarios de U.F.C. / Placa de cada tratamiento y especie. Se representaron gráficamente para poder visualizar los periodos de latencia de cada tratamiento.
- La mortalidad acaecida en cada placa, tratamiento y especie a los 14 días de comenzar el experimento. Estos valores se representaron en unos diagramas de barra incluyendo las barras de error.

Se estudió también una regresión polinomial entre las medidas de U.F.C./placa y las dosis de UV-C recibidas (kJ/m^2) a los 14 días.

3.13. Supuesto práctico de comparación económica de los distintos tratamientos estudiados

Se planteó un supuesto práctico con datos estimativos para estudiar, empleando criterios económicos como el VAN (Valor Actual Neto), TIR (Tasa Interna de Retorno) o el Periodo de Retorno, la rentabilidad de implantar un equipo en una empresa para aplicar uno de los 4 tratamientos de UV-C vistos en este trabajo. Recordamos las ecuaciones del VAN (ECUACIÓN 2) y la del TIR (ECUACIÓN 3).

$$\text{VAN} = \sum_{t=1}^n \frac{R_j}{(1+i)^t} - I_0 \quad (\text{ECUACIÓN 2})$$

$$\text{VAN} = \sum_{t=1}^n \frac{R_j a}{(1+TIR)^t} - I_0 = 0 \quad (\text{ECUACIÓN 3})$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se muestrearon un total de 100 melones (60 galias y 40 cantalupos). De estos frutos se consiguió obtener una primera cifra de aislados alta, que posteriormente fue cribada y reducida (por criterios de semejanza entre sí de ciertos aislados) hasta un número de 19 aislados aparentemente distintos.

Estos 19 aislados fueron identificados genéticamente por PCR. La homología para todas las especies identificadas estuvo entre el 99-100%. En total se obtuvieron ocho especies de *Fusarium*: *Fusarium brachygibbosum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium longipes*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium solani*. En el caso de *F. solani* y *F. proliferatum* fueron identificadas en varios de los aislados.

Se identificaron dos especies inesperadas (*Acremonium sclerotigenum* y *Sarocladium strictum*) a partir de un mismo aislado, muy próximas a especies de *Fusarium*. Este hecho se debe a que el aislado en cuestión, comparte entre un 99 y un 100% de semejanza genética con ambas especies (aparentemente la diferencia es mínima) así que no es posible asignar uno de los dos resultados y descartar el otro. Por ello, de ahora en adelante en este documento, se tratará al aislado en concreto asociado a una de las dos especies sin especificar cuál de las dos es la correcta.

Para acompañar a esta información, también se caracterizaron morfológicamente cada una las especies anteriores. Se observaron sus caracteres morfológicos primarios (tipo de fructificaciones, morfología, cantidad etc.) y secundarios (micelio aéreo, desarrollo de las colonias y/o pigmentación) y se anotaron en unas fichas técnicas. En el apartado 4.2 se muestra un modelo de ficha de *F. brachygibbosum* a modo de ejemplo. Las demás se pueden consultar en el documento **Anexo II: Fichas técnicas de especies identificadas**.

Los resultados obtenidos tras la realización de estas caracterizaciones son bastante reveladores. Por ejemplo, *F. equiseti* y *F. chlamydosporum* mostraron unos caracteres tanto primarios como secundarios prácticamente idénticos. *F. oxysporum* y *F. longipes* presentaron unos caracteres secundarios muy similares, pero se diferencian en sus estructuras reproductivas. *F. solani* no compartió caracteres secundarios con ninguna otra especie identificada y sus caracteres primarios son también únicos porque

no produjo clamidosporas ni apenas microconidios. *F. fujikuroi* y *F. proliferatum*, sin embargo, no produjeron ni macroconidios ni clamidosporas, pero difirieron en sus caracteres secundarios. *F. brachygibbosum* y *F. oxysporum* compartieron algunos caracteres secundarios y tuvieron caracteres primarios muy similares. Todos estos aspectos se pueden leer con más detalles en las mencionadas fichas técnicas.

4.1. Ejemplo de ficha técnica

<i>Fusarium brachygibbosum</i>
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS EXTERNAS
<p>El micelio que se desarrolla por el agar otorga al medio de cultivo un color marrón terroso u ocráceo en el anverso de la/s colonia/s (Figura 1.A) siendo el reverso de un tono aún más oscuro de ese mismo color. Aparecen pequeñas islas de micelio aéreo algodonoso de color blanco que se desarrollan aleatoriamente por la superficie. A veces estas islas de micelio presentan un halo rosado o amarillo en la periferia o pequeñas manchas de estas mismas tonalidades.</p>
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL MICELIO
<p>Las hifas son hialinas, presentan tabiques, abundantes ramificaciones y pueden alcanzar grosores máximos de hasta 5 μm (Figura 1.D).</p>
CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS
<p>En los extremos de las hifas aparecen con frecuencias clamidosporas rugosas hialinas (Figura 1.B) de entre 7,5 y 12,5 μm de diámetro. Éstas llegan a aparecer incluso en parejas (Figura 1.C), pero no es lo más habitual, al igual que no parecen producir clamidosporas intercalares. Esta especie produce una elevada cantidad de macroconidios fusiformes de entre 20 - 32,5 μm de longitud y 3,75 - 5 μm de anchura, hialinos y septados. Normalmente suelen presentar entre 1 y 4 tabiques. También es frecuente encontrar dichos macroconidios aún sin madurar con formas rectangulares y alargadas, sin septar o con 1 o 2 tabiques a lo sumo y tamaños que alcanzan como mucho 10 - 12,5 μm de longitud y 2,5 μm de anchura (Figura 1.E). A estos macroconidios sin madurar también se les puede llamar mesoconidios. Al microscopio también es frecuente encontrar fiálides y macroconidios aún unidos a éstas preparados para ser liberados al medio (Figura 1.F).</p>

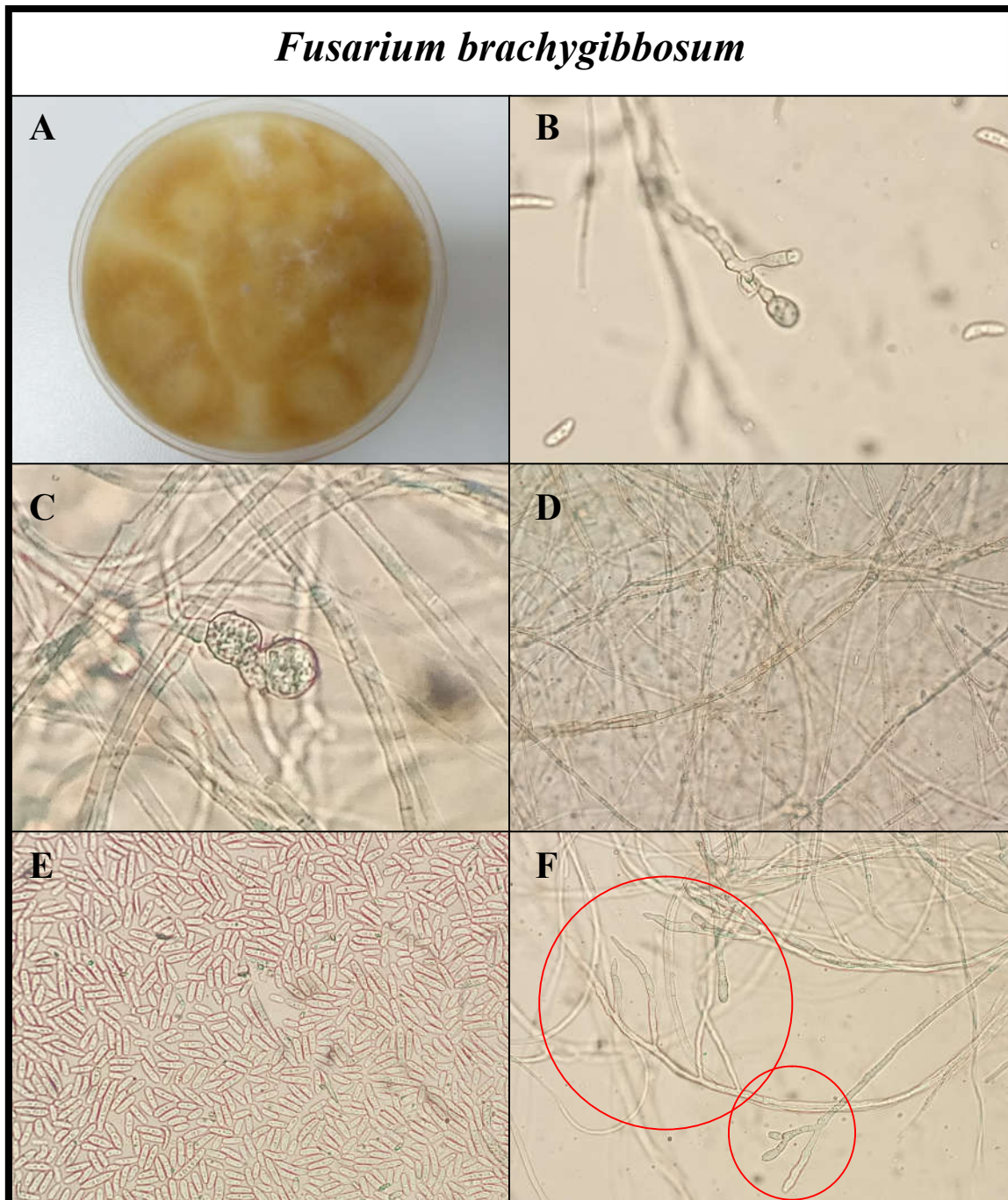


Figura de Anejo. Cultivo de *Fusarium brachygibbosum* en medio agar PDA con estreptomina (A). Detalles microscópicos de sus clamidosporas terminales aisladas (B) y en parejas (C), los tabiques y ramificaciones de sus hifas (D), sus macroconidios tanto maduros como inmaduros (E) y fiálides (F). (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Fuente: elaboración propia).

4.2. Estudios de patogenicidad

Aunque se llevaron a cabo experimentos de patogenicidad con las distintas especies en las respectivas variedades de melón de las que fueron aisladas, los resultados fueron prácticamente idénticos tanto en melones Galia como Cantalupo. El

factor especie tampoco influyó, o no al menos de una manera concluyente. Por ello, se considera innecesario y redundante describir uno a uno los resultados obtenidos con cada especie.

El desarrollo del hongo en el melón, de manera general, se produjo de una forma expansiva tanto en profundidad como en superficie. Transcurrida una semana, el micelio se abrió camino a través de la herida del melón alcanzando profundidades de hasta unos 3-5 cm. En su avance a través de los tejidos del fruto, el hongo produjo dos síntomas principales: El primer síntoma es que el tejido del mesocarpo inmediatamente colindante con el epicarpio, adquirió una textura oleosa, parda y translúcida (FIGURAS 7.A, 7.B y 7.C). Este pardeamiento se tradujo en un reblandecimiento del tejido bajo la corteza, que se volvió blanda al tacto e incluso pudo llegar a deprimirse el tejido alrededor de la herida. Este síntoma es fácilmente apreciable a simple vista y es un buen indicativo para saber que el hongo ha colonizado el interior del fruto.

El segundo síntoma que causó el hongo al penetrar en el melón se puede definir como una deshidratación esponjosa de la pulpa del fruto justo por debajo de la lesión. Para apreciar estos síntomas era necesario seccionar y examinar el melón en su interior. Este síntoma de la pulpa, alcanzó profundidades de hasta unos 5 cm en una semana, pero depende de la velocidad de desarrollo de la podredumbre, pudiendo alcanzar mayores profundidades. Se puede describir como una mancha seca, blanca y diferenciada del tejido sano (FIGURAS 7.B, 7.C y 7.D). Como resultado de la pérdida de textura de los tejidos del melón, se producen oquedades y galerías huecas (FIGURA 7.B) en algunos casos. A diferencia del pardeamiento que se produce bajo el epicarpio que se extendía en superficie bajo la corteza, el secado del mesocarpo se extiende principalmente en profundidad. Esto se debe a la proliferación del hongo por este tejido.

En los ensayos llevados a cabo con melones de la variedad Galia, es frecuente que en estas oquedades originadas en el mesocarpo aparezca micelio aéreo, a pesar de ser un entorno prácticamente aislado del exterior. Al aparecer micelio en un entorno tan pequeño, las hifas llenan completamente la oquedad otorgando una apariencia que podría calificarse de harinosa o pulverulenta (FIGURA 7.D). En algunos casos, podría formar una especie de quistes formados por tejido hifal compacto. Estas estructuras las hemos detectado en otras variedades de frutos de melón cuando estos son podridos por *Cladosporium*, pero no lo hemos observado en podredumbres por *Fusarium*.

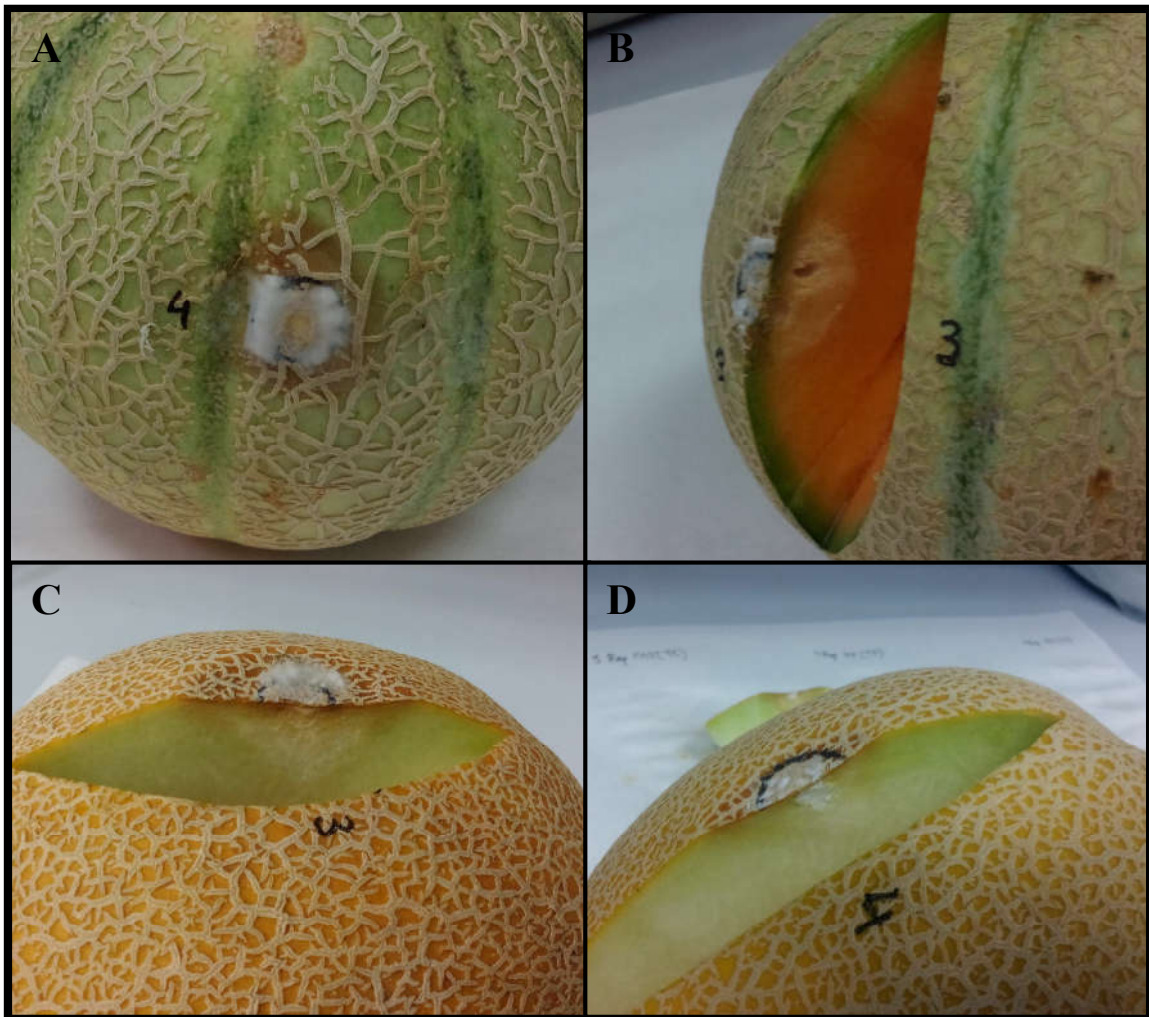


FIGURA 7. Detalles del pardeamiento subepicárpico (A, B y C) y el secado de la pulpa en el mesocarpo (B, C y D) ocasionado en melones Cantalupo y Galia por *Fusarium* spp.

Fuente: elaboración propia (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena).

4.3. Experimentación con radiación UV-C

A continuación, se muestran para cada una de las especies con las que se llevó a cabo el experimento una tabla (TABLAS 2-10) con resultados promediados de los conteos de U.F.C./placa que se llevaron a cabo diariamente. Se incluyen también unos análisis estadísticos básicos.

TABLA 2. Recuentos de colonias en *F. brachygibbosum* tras el experimento con UV-C.

<i>F. brachygibbosum</i>		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 14
C	Valor Medio U.F.C/placa	0	25	25	25	25	25
	Desviación Estándar (s)	0,00	4,33	4,36	4,36	4,36	4,36
T1	Valor Medio U.F.C/placa	4	10	13	13	14	14
	Desviación Estándar (s)	5,34	4,23	5,35	5,22	5,28	5,68
T2	Valor Medio U.F.C/placa	0	10	14	10	10	10
	Desviación Estándar (s)	0,35	5,60	7,00	4,50	4,90	4,90
T3	Valor Medio U.F.C/placa	0	0	4	4	7	8
	Desviación Estándar (s)	0,00	0,00	3,29	3,61	4,13	5,54
T4	Valor Medio U.F.C/placa	0	0	3	4	4	4
	Desviación Estándar (s)	0,00	0,73	3,02	3,09	3,09	3,09

Para T1 = 1,05 kJ/m², T2 = 3,15 kJ/m², T3 = 9,45 kJ/m² y T4 = 31,5 kJ/m².

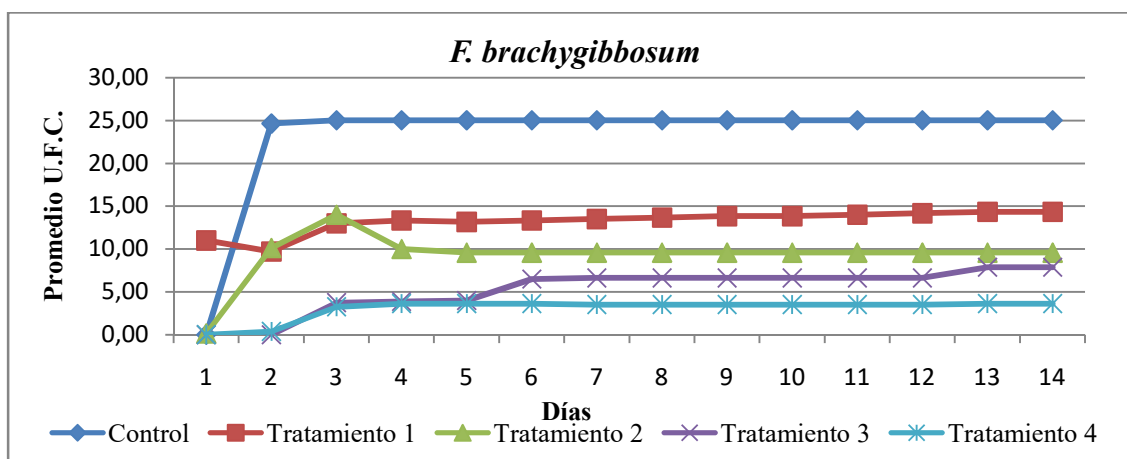


FIGURA 8. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de *F. brachygibbosum*.

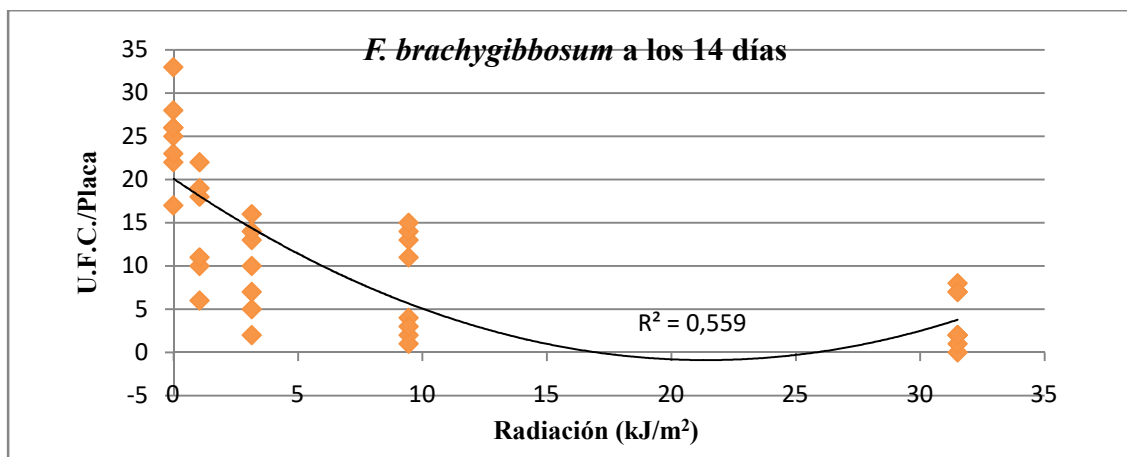


FIGURA 9. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m²) en *F. brachygibbosum*.

TABLA 3. Recuentos de colonias en *F. chlamydosporum* tras el experimento con UV-C.

<i>F. chlamydosporum</i>		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 14
C	Valor Medio U.F.C/placa	0	96	97	97	97	97
	Desviación Estándar (s)	0,33	32,07	31,96	32,41	32,41	32,41
T1	Valor Medio U.F.C/placa	0	35	38	38	38	38
	Desviación Estándar (s)	0,00	18,52	20,54	20,54	20,71	20,71
T2	Valor Medio U.F.C/placa	0	42	42	43	43	43
	Desviación Estándar (s)	0,33	17,26	17,40	17,41	17,41	17,41
T3	Valor Medio U.F.C/placa	0	18	19	19	19	19
	Desviación Estándar (s)	0,48	12,54	11,66	12,31	12,31	12,31
T4	Valor Medio U.F.C/placa	0	0	0	0	0	1
	Desviación Estándar (s)	0,00	0,33	0,43	0,43	0,43	0,49

Para T1 = 1,05 kJ/m², T2 = 3,15 kJ/m², T3 = 9,45 kJ/m² y T4 = 31,5 kJ/m².

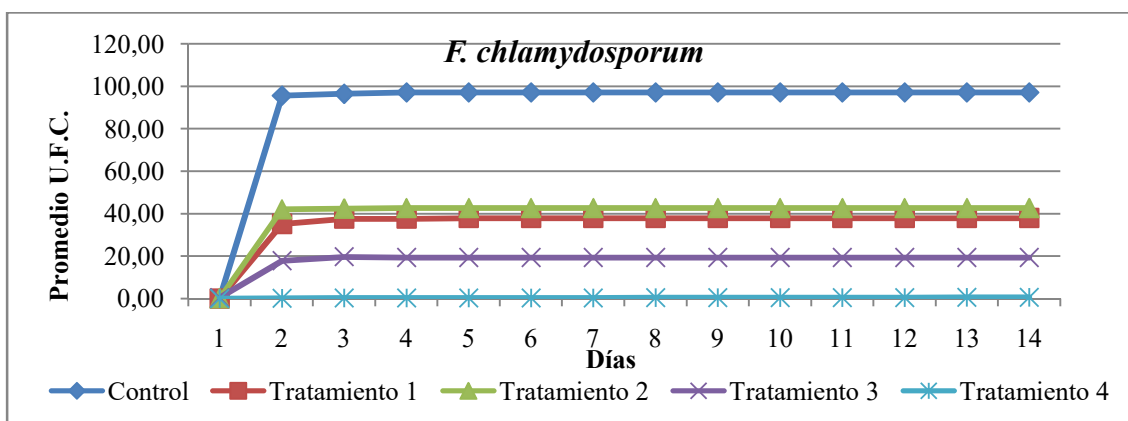


FIGURA 10. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de *F. chlamydosporum*.

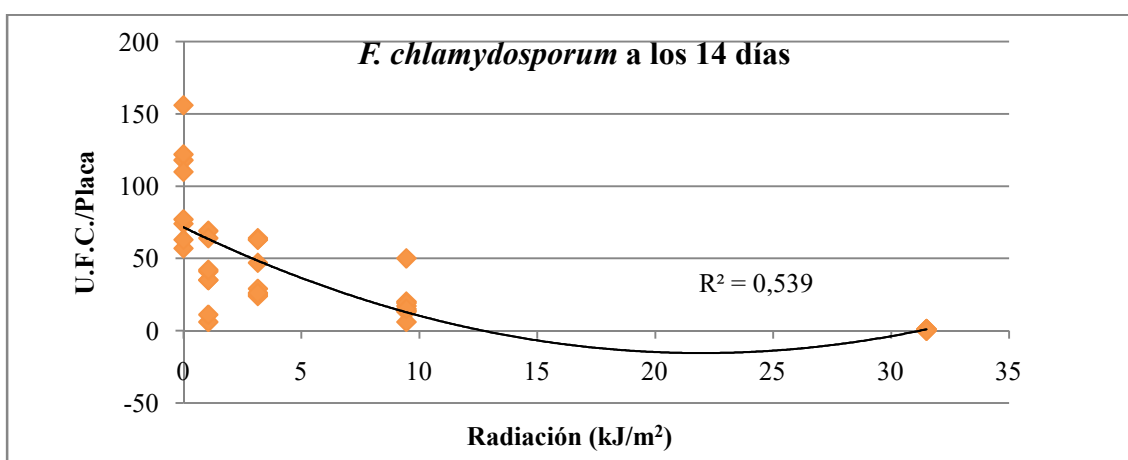


FIGURA 11. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m²) en *F. chlamydosporum*.

TABLA 4. Recuentos de colonias en *F. equiseti* tras el experimento con UV-C.

<i>F. equiseti</i>		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 14
C	Valor Medio U.F.C./placa	0	66	68	68	68	68
	Desviación Estándar (s)	0,00	17,61	16,35	16,51	16,51	16,51
T1	Valor Medio U.F.C./placa	4	34	35	35	35	35
	Desviación Estándar (s)	6,16	17,39	17,25	17,25	17,56	17,56
T2	Valor Medio U.F.C./placa	0	41	47	47	48	48
	Desviación Estándar (s)	0,43	14,00	12,70	12,70	12,84	12,84
T3	Valor Medio U.F.C./placa	3	9	12	12	12	12
	Desviación Estándar (s)	5,59	4,24	4,36	5,53	4,58	4,58
T4	Valor Medio U.F.C./placa	0	2	7	7	7	8
	Desviación Estándar (s)	0,00	3,28	6,18	6,36	6,96	7,05

Para T1 = 1,05 kJ/m², T2 = 3,15 kJ/m², T3 = 9,45 kJ/m² y T4 = 31,5 kJ/m².

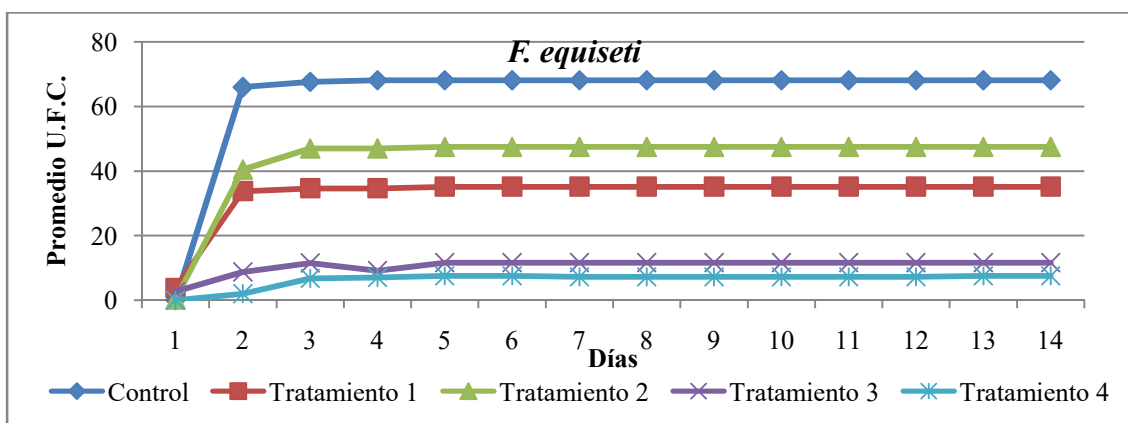


FIGURA 12. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de *F. equiseti*.

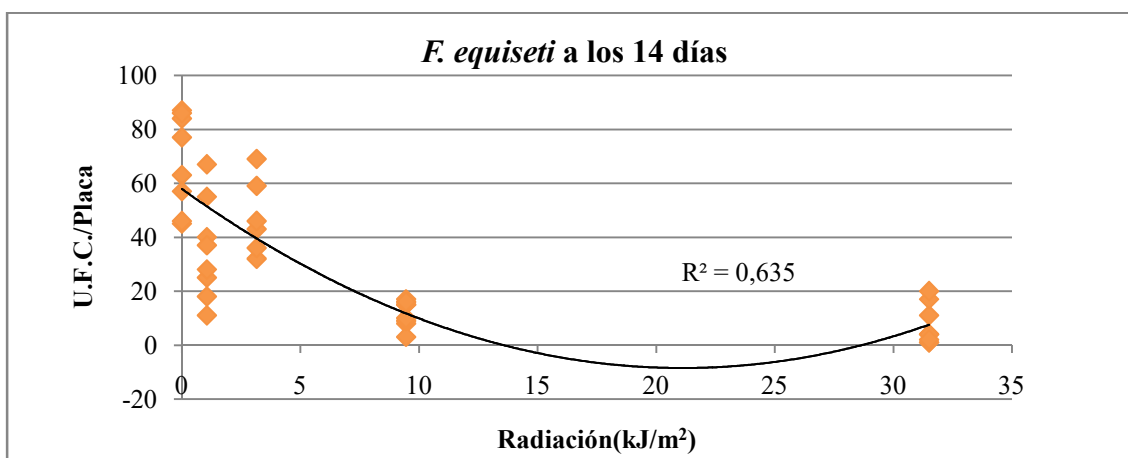


FIGURA 13. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m²) en *F. equiseti*.

TABLA 5. Recuentos de colonias en *F. fujikuroi* tras el experimento con UV-C.

<i>F. fujikuroi</i>		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 14
C	Valor Medio U.F.C./placa	2	199	199	199	199	199
	Desviación Estándar (s)	2,1	27,0	27,1	27,0	27,0	27,0
T1	Valor Medio U.F.C./placa	0	56	57	57	56	56
	Desviación Estándar (s)	0,0	19,3	19,3	20,1	20,2	20,2
T2	Valor Medio U.F.C./placa	0	53	60	60	59	59
	Desviación Estándar (s)	0,4	32,5	31,2	31,2	31,7	31,7
T3	Valor Medio U.F.C./placa	0	3	8	9	10	10
	Desviación Estándar (s)	0,4	1,4	3,0	3,4	3,4	3,4
T4	Valor Medio U.F.C./placa	0	0	4	4	4	4
	Desviación Estándar (s)	0,0	0,0	3,7	4,1	4,1	4,1

Para T1 = 1,05 kJ/m², T2 = 3,15 kJ/m², T3 = 9,45 kJ/m² y T4 = 31,5 kJ/m².

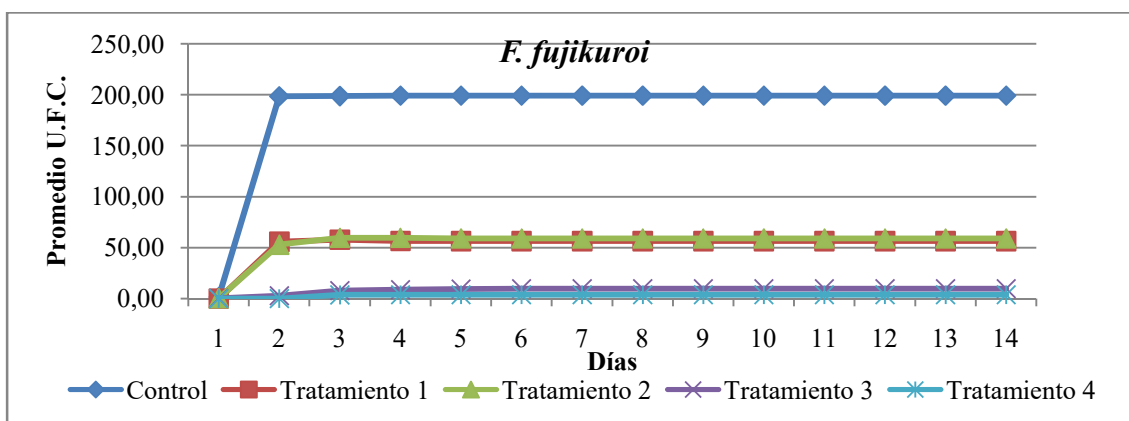


FIGURA 14. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de *F. fujikuroi*.

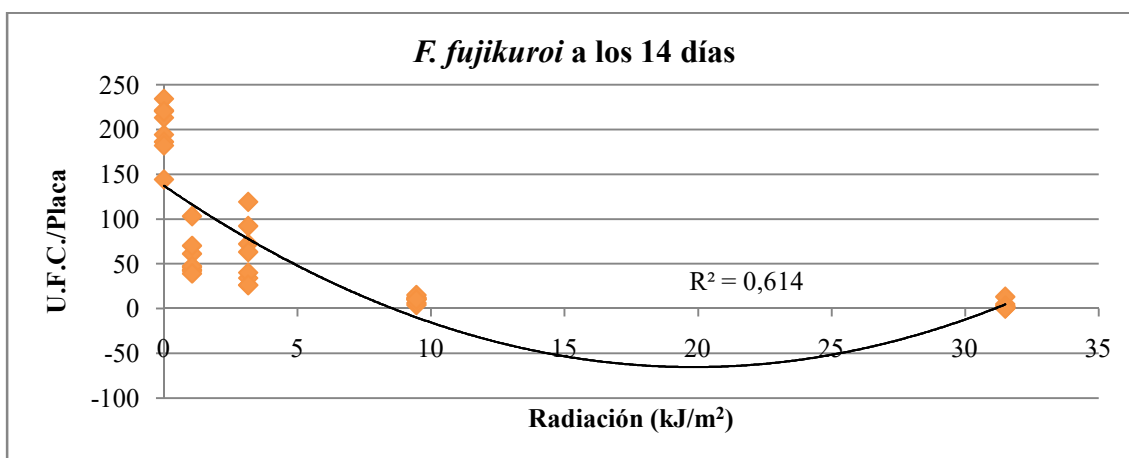


FIGURA 15. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m²) en *F. fujikuroi*.

TABLA 6. Recuentos de colonias en *F. longipes* tras el experimento con UV-C.

<i>F. longipes</i>		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 14
C	Valor Medio U.F.C/placa	0	0	0	0	0	0
	Desviación Estándar (s)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T1	Valor Medio U.F.C/placa	1	0	0	0	0	0
	Desviación Estándar (s)	1,3	0,0	0,0	0,7	0,7	0,7
T2	Valor Medio U.F.C/placa	3	0	0	1	1	1
	Desviación Estándar (s)	5,4	0,0	0,0	1,3	1,5	1,5
T3	Valor Medio U.F.C/placa	0	13	14	14	14	14
	Desviación Estándar (s)	0,3	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
T4	Valor Medio U.F.C/placa	0	0	1	1	1	1
	Desviación Estándar (s)	0,0	0,3	1,3	1,3	0,5	0,5

Para T1 = 1,05 kJ/m², T2 = 3,15 kJ/m², T3 = 9,45 kJ/m² y T4 = 31,5 kJ/m².

TABLA 7. Recuentos de colonias en *F. oxysporum* tras el experimento con UV-C.

<i>F. oxysporum</i>		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 14
C	Valor Medio U.F.C/placa	0	11	12	12	12	12
	Desviación Estándar (s)	0,0	5,9	6,2	6,2	6,2	6,2
T1	Valor Medio U.F.C/placa	1	14	16	16	16	16
	Desviación Estándar (s)	1,6	4,2	4,7	4,3	4,3	4,3
T2	Valor Medio U.F.C/placa	1	12	17	17	18	19
	Desviación Estándar (s)	1,3	11,9	14,5	14,7	14,9	14,9
T3	Valor Medio U.F.C/placa	0	0	3	3	3	3
	Desviación Estándar (s)	0,0	0,5	2,6	2,8	2,8	3,0
T4	Valor Medio U.F.C/placa	0	0	7	8	9	9
	Desviación Estándar (s)	0,7	0,0	4,7	4,9	4,8	4,6

Para T1 = 1,05 kJ/m², T2 = 3,15 kJ/m², T3 = 9,45 kJ/m² y T4 = 31,5 kJ/m².

TABLA 8. Recuentos de colonias en *F. proliferatum* tras el experimento con UV-C.

<i>F. proliferatum</i>		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 14
C	Valor Medio U.F.C/placa	0	127	128	128	128	128
	Desviación Estándar (s)	0	20,3	20,3	20,3	20,3	20,3
T1	Valor Medio U.F.C/placa	14	13	13	14	14	14
	Desviación Estándar (s)	19,0	7,8	7,8	8,0	8,0	8,0
T2	Valor Medio U.F.C/placa	0	48	53	53	53	53
	Desviación Estándar (s)	0,3	13,2	14,5	14,5	14,5	14,5
T3	Valor Medio U.F.C/placa	3	3	3	1	1	1
	Desviación Estándar (s)	5,0	5,0	5,2	0,8	0,7	0,7
T4	Valor Medio U.F.C/placa	0	0	15	15	16	16
	Desviación Estándar (s)	0,0	0,7	17,1	18,2	18,7	18,5

Para T1 = 1,05 kJ/m², T2 = 3,15 kJ/m², T3 = 9,45 kJ/m² y T4 = 31,5 kJ/m².

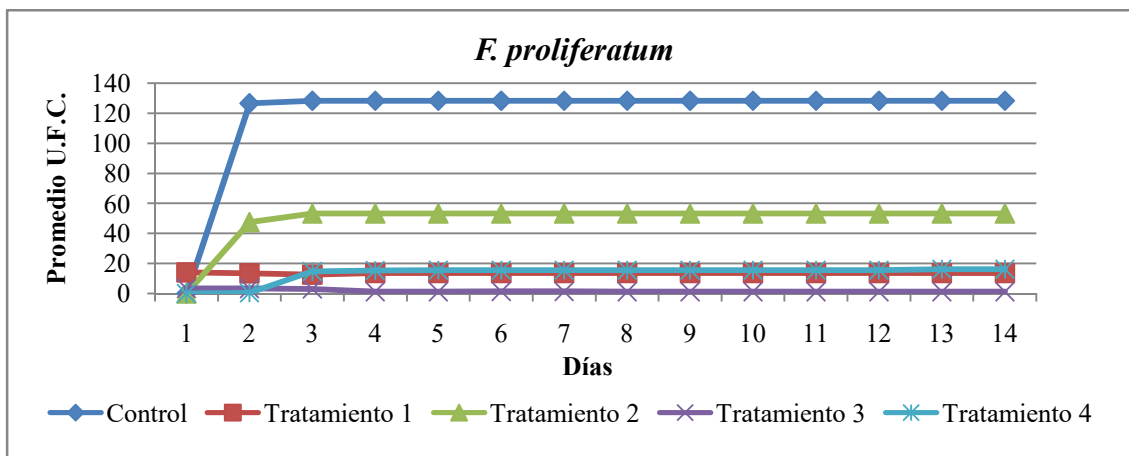


FIGURA 16. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de *F. proliferatum*.

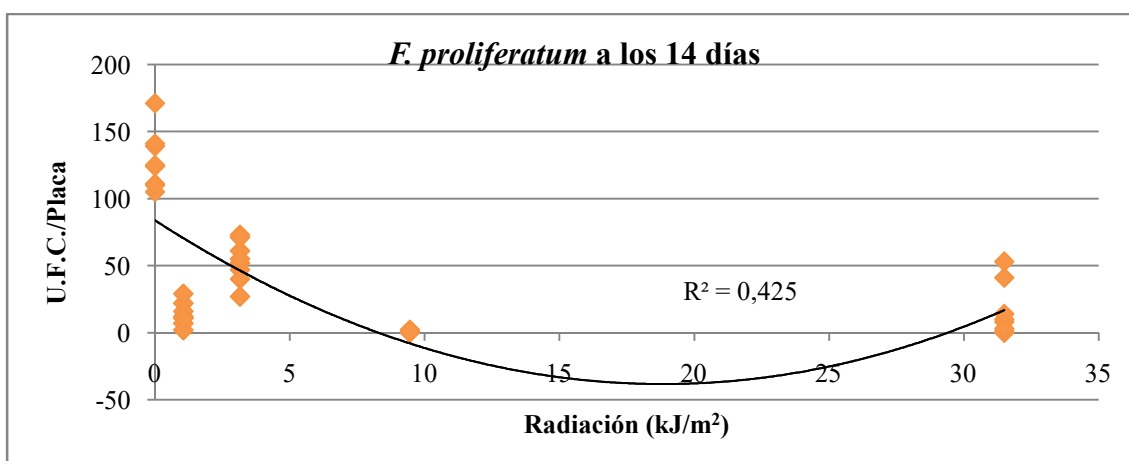


FIGURA 17. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m^2) en *F. proliferatum*.

TABLA 9. Recuentos de colonias en *F. solani* tras el experimento con UV-C.

<i>F. solani</i>		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 14
C	Valor Medio U.F.C/placa	0	50	50	50	50	50
	Desviación Estándar (s)	0,0	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5
T1	Valor Medio U.F.C/placa	0	20	22	23	23	23
	Desviación Estándar (s)	1,7	6,5	6,5	5,9	5,6	5,6
T2	Valor Medio U.F.C/placa	0	31	33	33	33	33
	Desviación Estándar (s)	0,0	13,9	15,0	15,0	14,9	14,9
T3	Valor Medio U.F.C/placa	0	2	4	12	17	17
	Desviación Estándar (s)	0,3	1,2	4,1	5,5	5,7	5,7
T4	Valor Medio U.F.C/placa	0	1	4	5	6	6
	Desviación Estándar (s)	0,3	0,7	5,3	5,4	5,2	5,8

Para T1 = 1,05 kJ/m^2 , T2 = 3,15 kJ/m^2 , T3 = 9,45 kJ/m^2 y T4 = 31,5 kJ/m^2 .

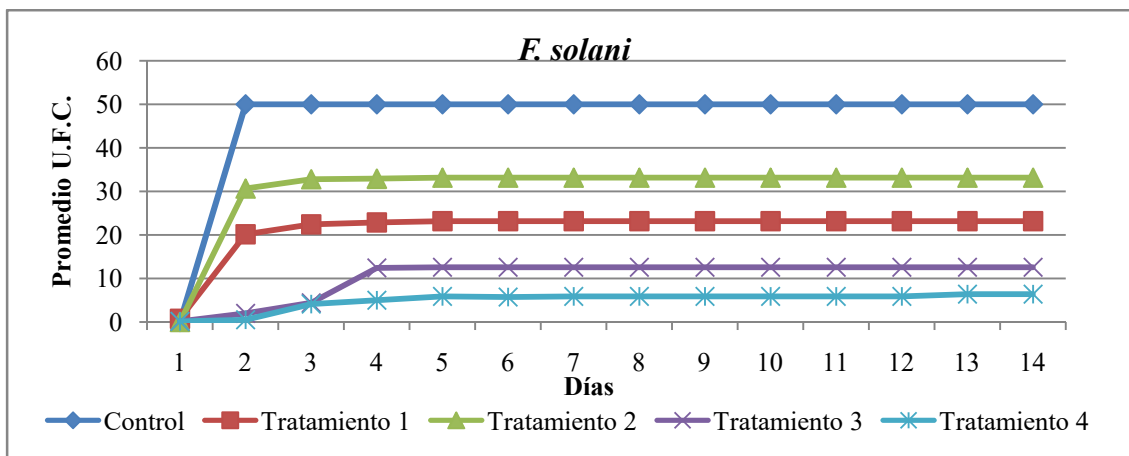


FIGURA 18. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de *F. solani*.

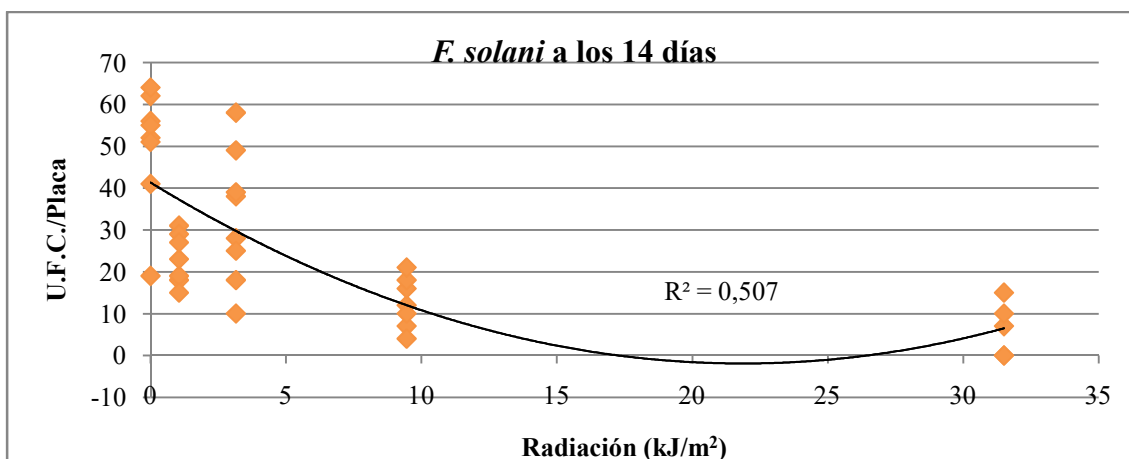


FIGURA 19. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m²) en *F. solani*.

TABLA 10. Recuentos de colonias en *A. sclerotigenum* – *S. strictum* tras el experimento con UV-C.

<i>A. sclerotigenum</i> - <i>S. strictum</i>		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7	Día 14
C	Valor Medio U.F.C/placa	9	98	99	101	101	102
	Desviación Estándar (s)	13,0	49,2	48,9	46,8	46,5	46,0
T1	Valor Medio U.F.C/placa	59	73	73	59	60	64
	Desviación Estándar (s)	64,0	2,0	2,0	16,9	16,2	15,6
T2	Valor Medio U.F.C/placa	4	84	84	84	84	84
	Desviación Estándar (s)	5,7	37,0	35,6	35,5	35,5	35,5
T3	Valor Medio U.F.C/placa	0	32	41	41	42	42
	Desviación Estándar (s)	0,0	21,5	18,2	19,3	17,4	17,4
T4	Valor Medio U.F.C/placa	0	0	2	3	3	3
	Desviación Estándar (s)	0,3	0,0	1,7	2,2	2,3	2,3

Para T1 = 1,05 kJ/m², T2 = 3,15 kJ/m², T3 = 9,45 kJ/m² y T4 = 31,5 kJ/m².

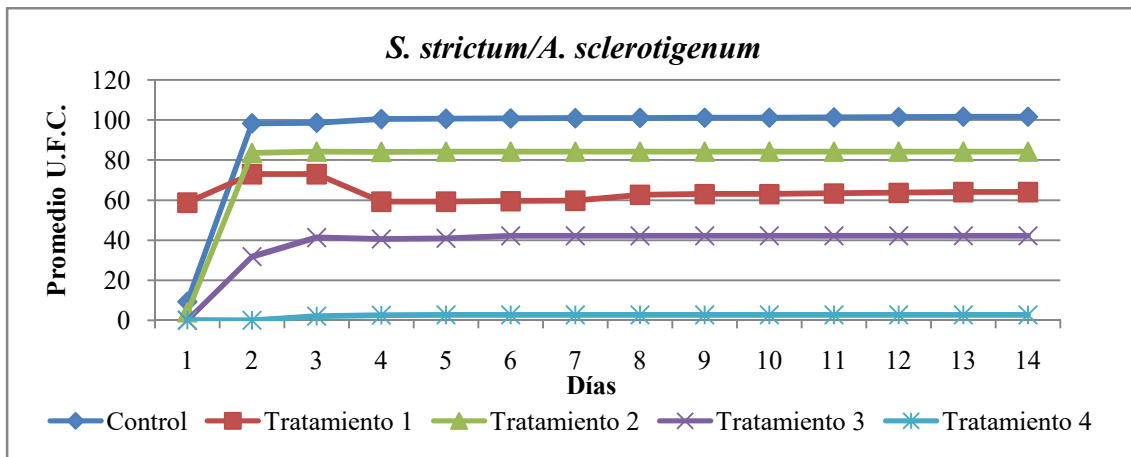


FIGURA 20. Evolución del promedio de U.F.C./Placa y la fase de latencia en los distintos tratamientos de *A. sclerotigenum* – *S. strictum*.

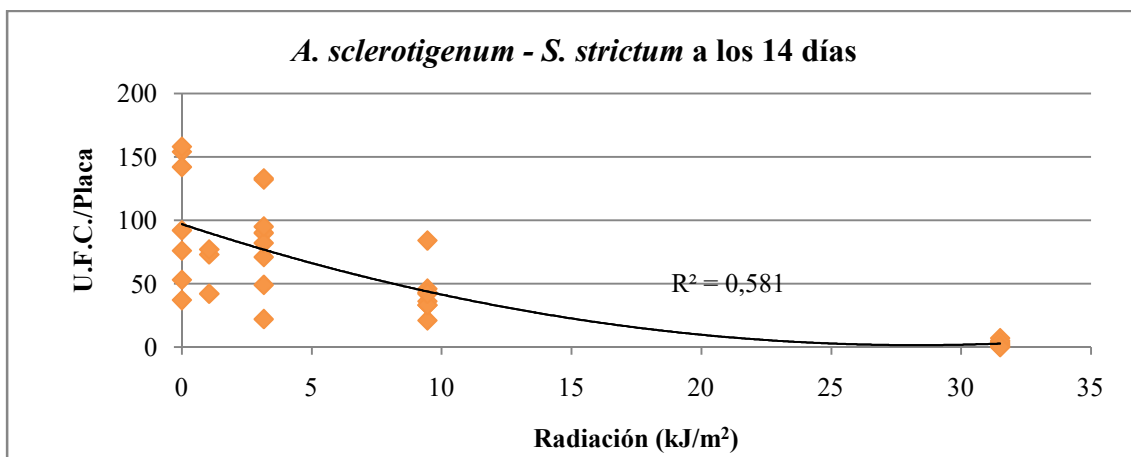


FIGURA 21. Regresión entre U.F.C./placa y radiación recibida (kJ/m²) en *A. sclerotigenum* – *S. strictum*.

De las nueve especies aisladas, *F. oxysporum* y *F. longipes* presentaron unos niveles de contaminación muy altos en las placas Control, Tratamiento 1 y Tratamiento 2, ocasionados por la colonización del medio de cultivo por otros microorganismos. Esto pudo ocurrir porque la suspensión de conidios se irradió dentro del aparato con las placas abiertas para recibir la radiación directa y este punto tuvo que ser crítico. Los escasos resultados que se obtuvieron de recuento de U.F.C. en los Tratamiento 3 y Tratamiento 4 no se pudieron referenciar a ningún Control y por lo tanto no se pudo calcular la mortalidad sufrida por los conidios. Los resultados obtenidos en estas dos especies se han considerado inconcluyentes (por esto sólo se han mostrado los valores

tabulados de la evolución del promedio de colonias por placa y tratamiento diario con sus desviación estándar). En el resto de aislados también apareció contaminación en alguna que otra placa, pero no lo suficiente como para impedir el desarrollo de colonias de *Fusarium*.

De las restantes siete especies con las que se llevó a cabo el experimento, se pudo observar una marcada latencia de las especies de *Fusarium* expuestas a radiación con respecto a las placas control. En las primeras 24 horas del experimento podían comenzar a verse germinar los primeros conidios en la mayoría de placas Control. En contraposición las placas de los Tratamiento 1, Tratamiento 2, Tratamiento 3 y Tratamiento 4 no comenzaron a germinar hasta el tercer o cuarto día, y en algunos casos prácticamente nunca. Esto pudo ser debido a un efecto fungistático de la radiación que podría haber dañado las esporas y solamente un mecanismo de reparación celular interno pudo subsanar el problema, estimulando con retraso la germinación de los conidios.

También se ha podido observar que existe cierta regresión polinómica entre el número de conidios germinados y la radiación que estos recibieron (con valores de ajuste de regresión entre 0,51 y 0,64, exceptuando *F. proliferatum* con un valor de 0,43). A pesar de ello, podemos afirmar que no se puede estimar el número de colonias que aparecerán en una placa en función de la cantidad de UV-C recibida (de otro tratamiento distinto a los estudiados en este experimento) con mucha precisión, pero sí se aprecia que la radiación tiene un efecto positivo en la reducción de la supervivencia de las esporas, incluso dosis tan pequeñas como 1,05 o 3,15 kJ/m². A estas dosis ya se aprecia una mortalidad, aunque parece ser que una buena parte de los conidios sobreviven porque se produce un retardo de uno a dos días en la germinación. Creemos que este proceso fungistático se debe a la presencia de mecanismos reparadores que se inician en la célula en el momento de recibir el estímulo de la germinación en contacto con el medio de cultivo, horas después de recibir la radiación. Conforme aumentamos la dosis de radiación, estos efectos se ven más marcados, pero no aumentamos de manera decisiva la tasa mortalidad. Este efecto tiene una conclusión interesante ya que se deduce que bastan dosis pequeñas de radiación para obtener un efecto fungistático o fungicida, aunque no de forma decisiva.

Aplicando la ECUACIÓN 1 del apartado 3.11 a los recuentos de colonias de cada tratamiento y especie en el día 14, se obtuvieron los porcentajes de mortalidad en conidios al final del experimento (se consideró que, transcurridos estos 14 días con las curvas en fase estacionaria durante 11 a 13 días, dependiendo de la especie y tratamiento, los conidios no germinados medidos por el desarrollo de nuevas colonias, ya no iban a germinar y, por tanto, se consideraban ya no viables).

En la FIGURA 22 podemos observar que la mortalidad media de las esporas (transcurridos los 14 días de los experimentos) en algunas de las especies tratadas como por ejemplo *F. equiseti*, *F. solani*, *F. proliferatum* o *A. sclerotigenum-S. strictum* presentan unos valores un poco anómalos. Según estos valores medios, en estas especies la dosis recibida en el Tratamiento 1 (1,05 kJ/m²) surtió mejores efectos que la del Tratamiento 2 (3,15 kJ/m²). Sin embargo, si tenemos en cuenta los intervalos de error generados por la desviación entre los datos, podemos observar que el rango de valores que puede adquirir la mortalidad en esos casos no es tan disonante.

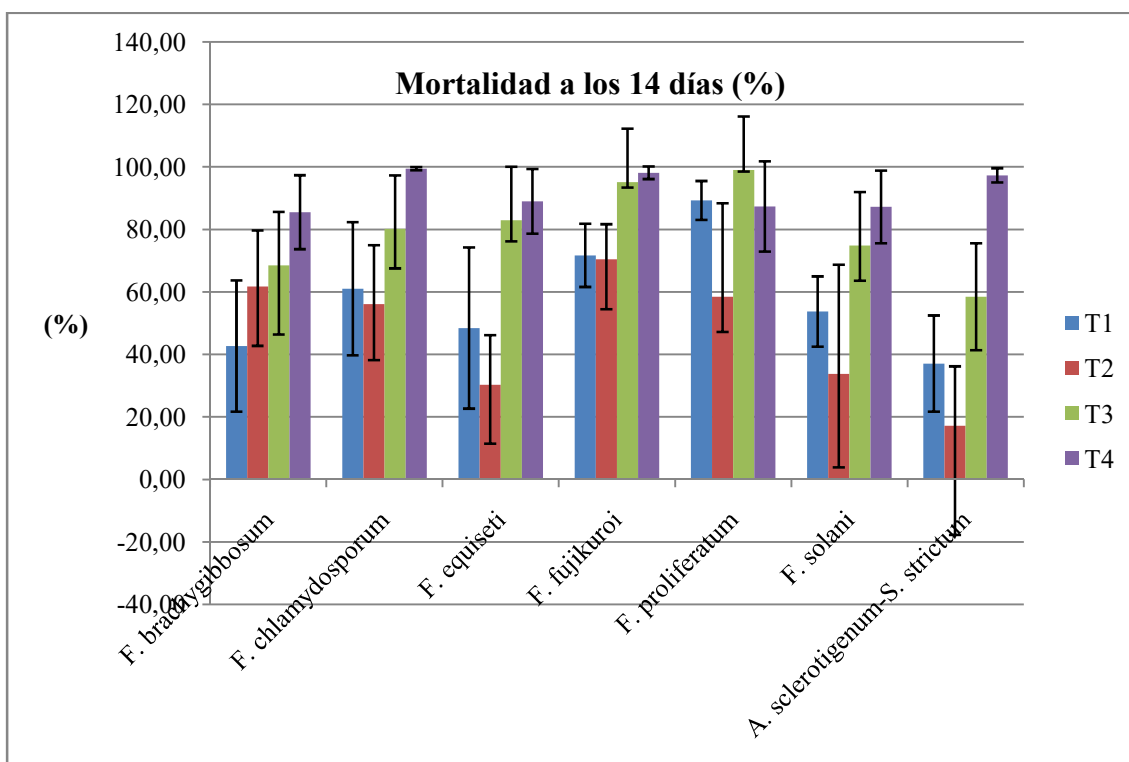


FIGURA 22. Comparativa de Mortalidad (%) a los 14 días entre las distintas especies.

En general, se puede apreciar que el Tratamiento 4 es el más efectivo, ocasionando tasas de mortalidad en los conidios superiores al 75%, y en algunos casos de prácticamente el 100%. El Tratamiento 3 tuvo una efectividad muy alta también, con

rangos de mortalidad entre el 42% y prácticamente el 100% en especies como *F. fujikuroi* o *F. proliferatum*. Para el caso de los Tratamientos 1 y 2, la diferencia entre los efectos causados en la mortalidad de las esporas no es tan significativa, exceptuando en *F. brachygibbosum*. En especies como *F. chlamydosporum* o *F. fujikuroi* adquieren unos rangos de valores muy similares. En cualquier caso, es evidente que incluso para las dosis de estos tratamientos se obtienen unos efectos en la mortalidad de los conidios bastante positivos.

Otro resultado muy interesante que se observó de este experimento fue el efecto que tuvo en el desarrollo de las colonias en las placas con mayor exposición a UV-C.

Para la mayoría de las especies, los Tratamientos 1, 2 y 3 no tuvieron mayores efectos exceptuando el del incremento de mortalidad/inactivación de los conidios existentes. Sin embargo, las esporas que fueron sometidas al Tratamiento 4, (y en el caso de especies como *F. brachygibbosum*, *F. oxysporum* y *F. proliferatum* también aquellas del Tratamiento 3) mostraron unos caracteres morfológicos secundarios idénticos, independientemente de la especie.

Todas las colonias que se desarrollaron lo hicieron de una manera muy lenta. En muchos de los casos, no habiendo llegado a ocupar la totalidad de la superficie de la placa e incluso habiendo pasado 25 días desde la realización del experimento (FIGURAS 23 A, B, C, D, E, F, G y H), cuando en el resto de placas de otros tratamientos hacían semanas que esto ya había sucedido.

Estas colonias además presentaron un color rosa salmón muy claro y un micelio aéreo casi inexistente, de textura y apariencia pulverulenta. En algunas de las especies como *F. chlamydosporum* (FIGURA 23.B) o *F. equiseti* (FIGURA 23.C) en las que el cambio de pigmentación de las colonias no fue tan drástico, este hecho pudo haber pasado desapercibido probablemente, pero en otras especies como *F. oxysporum* (FIGURA 23.E) o *F. proliferatum* (FIGURA 23.F) este cambio fue mucho más dramático.

Generalmente cambios en pigmentación y desarrollo de las colonias se suelen asociar a las condiciones y el medio de cultivo. Sin embargo, en este caso las condiciones y el medio fueron exactamente los mismos para todos los tratamientos y especies. Este hecho del cambio de caracteres secundario es bastante interesante, porque puede implicar que los daños que sufren los conidios previamente a su germinación

pueden influir en el futuro desarrollo del hongo y en qué caracteres secundarios se expresarán en este.

En la FIGURA 23 se muestran estos cambios en caracteres secundarios sufridos desde las placas Control (esquina superior izquierda) a las de Tratamiento 4 (esquina inferior derecha) de *F. brachygibbosum* (23.A), *F. chlamydosporum* (23.B), *F. equiseti* (23.C), *F. fujikuroi* (23.D), *F. oxysporum* (23.E), *F. proliferatum* (23.F), *F. solani* (23.G) y *S. strictum/A. sclerotigenum* (23.H).

Y si bien el cambio en los caracteres secundarios de desarrollo de las colonias es interesante, el cambio morfológico de los caracteres primarios sufridos es desconcertante.

Todas las especies volvieron a mostrar de nuevo una sintomatología común en las placas del Tratamiento 4, independientemente de las singularidades morfológicas que hubiesen mostrado antes de ser irradiadas. Ninguna de las especies mostró más estructuras reproductivas que microconidios. Estos, que aparecían en una cantidad desbordante, eran además en su mayoría esféricos y ovalados. (FIGURAS 24.B y C).

No se apreciaron existencia de clamidosporas, ni siquiera en especies como *F. brachygibbosum* o *F. oxysporum* en las que son una de las causas de sus pigmentaciones ocráceas. Tampoco se apreciaron macroconidios, que en especies como *F. solani* o *F. equiseti* eran muy abundantes previamente a sufrir los efectos de la radiación ultravioleta. En las hifas además se pudo apreciar una disminución de grosor, longitud, abundancia y formación de sinemas o agrupaciones hifales (FIGURA 24.A).

La producción exclusiva de microconidios podría explicar el lento desarrollo de estas colonias. Quizás los macroconidios permitan un desarrollo del micelio de este género de hongo mucho más rápido y eficaz y las deformaciones en las hifas y la escasa presencia de estas; sumado a la excesiva presencia de microconidios; podría explicar la apariencia pulverulenta de las colonias.

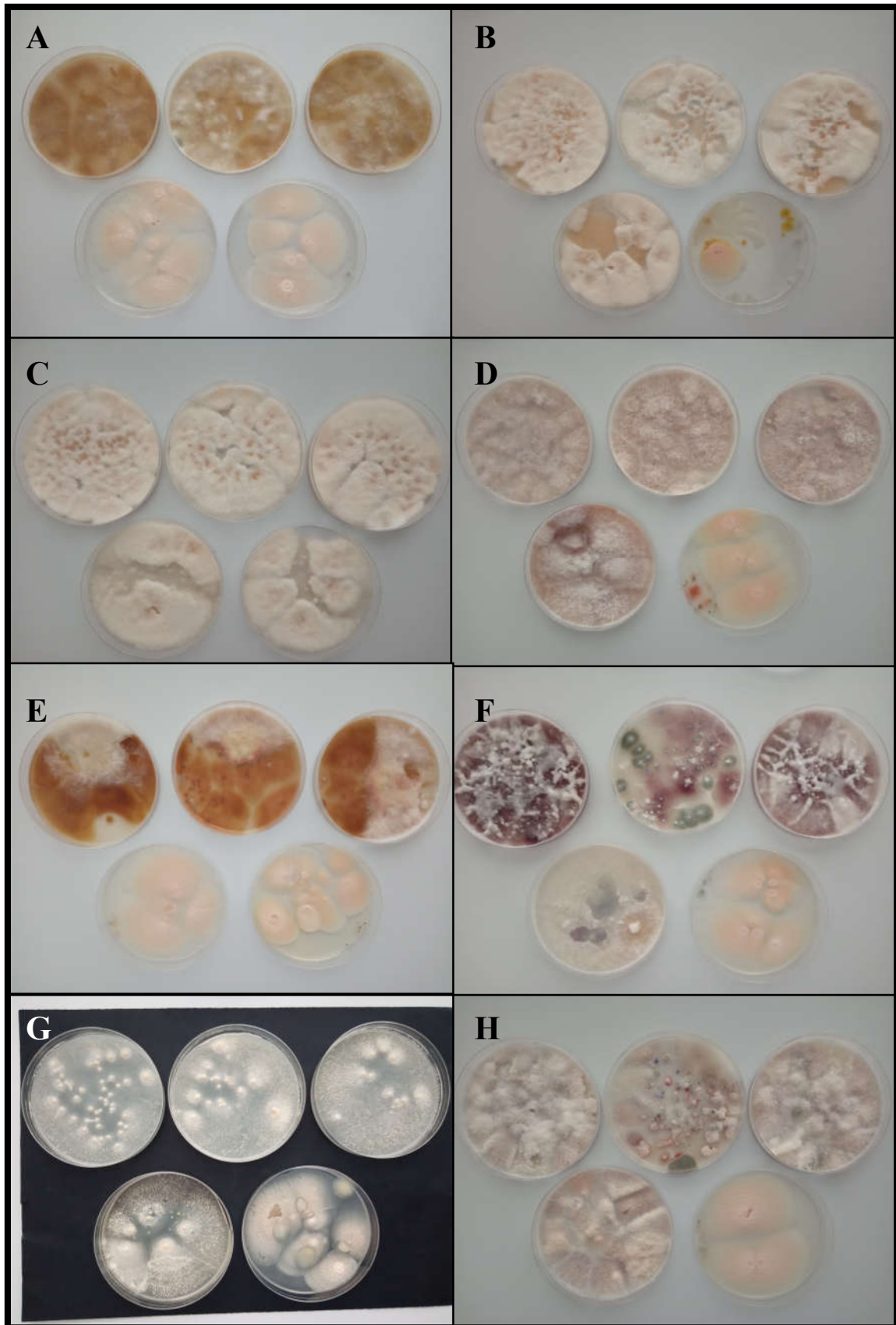


FIGURA 23. Repercusiones de los experimentos con UV-C transcurridos 25 días.

Fuente: elaboración propia (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena).

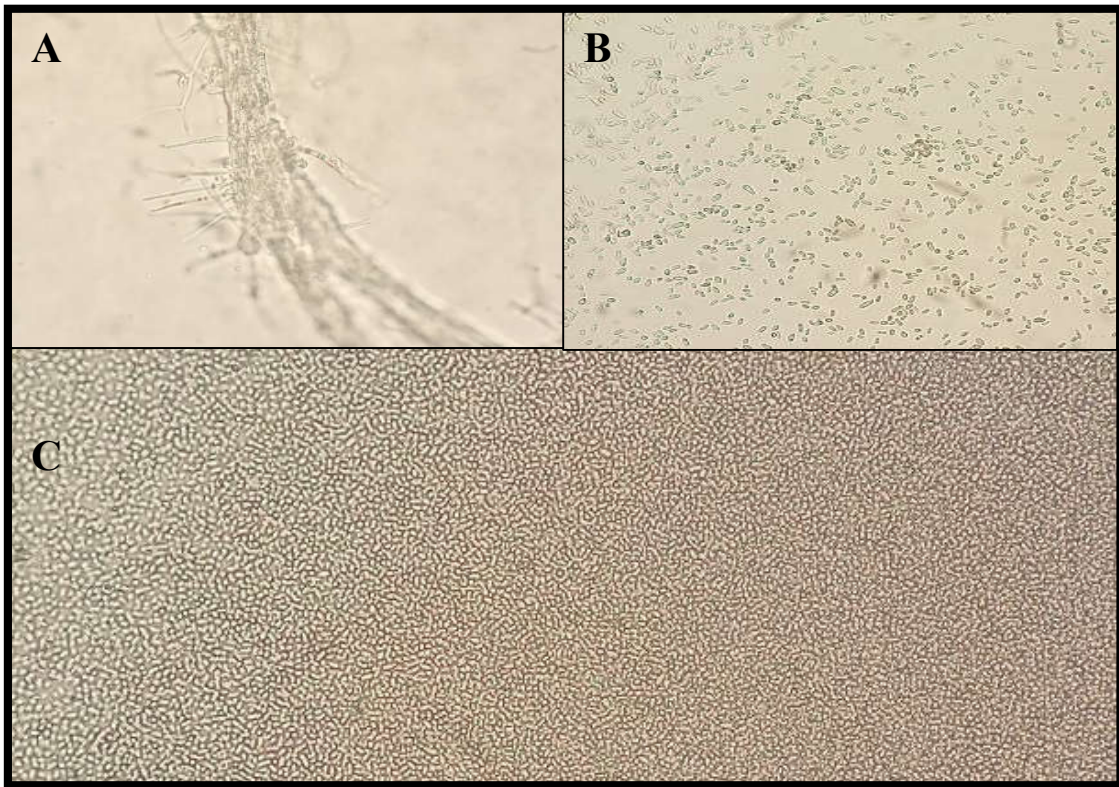


FIGURA 24. Sinema de hifas de una colonia de *S. strictum* – *A. sclerotigenum* (A) y detalle de microconidios de *F. proliferatum* (B) y su masificación en *F. brachygibbosum* (C).

Fuente: elaboración propia (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena).

Es muy posible que los daños causados por la radiación UV-C a la estructura genética de los conidios que consiguieron sobrevivir eliminara o alterara la expresión genética encargada de diferenciar cada especie. Este hecho se apoya en los datos obtenidos en las secuenciaciones genéticas de las PCR practicadas previamente a los aislados. En varias ocasiones, una misma muestra fue identificada para dos especies distintas con una homología superior al 99%, y no sólo en el caso de *S. strictum*/*A. sclerotigenum*.

El hecho de que menos de un 1% de los genes entre dos especies distintas sea lo único que las diferencia, refuerza esta idea. Para confirmarla sería necesario realizar estudios genéticos más exhaustivos, que podrían ser objeto de otro estudio distinto a este y de bastante interés.

5. SUPUESTO PRÁCTICO DE ANÁLISIS ECONÓMICO PARA COMPARAR LOS TRATAMIENTOS

Vamos a suponer que una empresa en la Región de Murcia pretende montar un pequeño equipo de tratamiento UV-C, con una dimensión interna de su cinta de transporte de 5 m de longitud y una anchura de esta de 1 m para poder equipar 5 lámparas GUV40WD de 40W (con una longitud total de 1,19 m y del cuerpo emisor de algo menos de un metro). Estas tienen un rendimiento de conversión potencia/irradiación de alrededor del 30%, por lo que emiten en torno a 12 W/m² de radiación UV-C a 254 nm (considerada la mejor longitud de onda para eliminar microorganismos).

En cada metro lineal de equipo hay 1 lámpara para garantizar una dosis de radiación interna de unos 11-12 W/m², similar a la estudiada en este trabajo. El coste de este equipo asciende a unos 50.000 € + un 10% de costes de mantenimiento anuales (5.000 €). Cada 8.000 h de trabajo hay que reponer las 5 lámparas, las cuales están valoradas en unos 500 € en total y no tienen valor residual. Además habría que contratar a un técnico y supervisor para este equipo, con un salario de 1.400 €/mes que asciende a un sobrecosto anual de 16.800 €.

Vamos a simular a continuación cuántas horas tendría que trabajar el equipo para poder tratar 1.000 toneladas de melón por campaña con cada uno de los tratamientos estudiados en este trabajo y estudiar cuál de ellos sería más rentable (conociendo que el coste de producción en campo del melón es de unos 0,34 €/kg, más unos 0,30 €/kg de costes en la empresa en personal, equipos auxiliares y consumo eléctrico, transporte etc. y un precio de venta del fruto, para el año 2018 en España de 0,74 €/kg). Para ello analizaremos económicamente cada situación teórica mediante los criterios del VAN, TIR y el Plazo de Recuperación.

Podemos relacionar la duración del tratamiento (T, (s)) con la velocidad de avance de la cinta transportadora (Y, (m/s)) que circula por el equipo y la longitud total de esta (L, (m)) mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{L \text{ (m)}}{Y \left(\frac{\text{m}}{\text{s}}\right)} = T \text{ (s)} \quad \text{(ECUACIÓN 4)}$$

Conociendo la velocidad de avance de la cinta (Y (m/s)) podemos multiplicar por el ancho de la cinta de transporte (W , (m)) para calcular la capacidad de trabajo de la misma (C , en m^2/s de superficie desplazada).

$$C \text{ (m}^2\text{/s)} = Y \text{ (m/s)} * W \text{ (m)} \quad \text{(ECUACIÓN 5)}$$

Por último, podemos despejar el número de melones que podemos tratar por segundo (M , (melones/s), dividiendo la capacidad de trabajo de nuestra cinta (C , (m^2/s)) entre la superficie que ocupa aproximadamente un melón. Los melones Galia y Cantalupo tienen un peso habitual que oscila entre 850 y 1.900 gramos (calibres 3 y 5). Se considera un peso medio de los frutos de 1,25 kg con un diámetro de 18 cm, el equivalente a un calibre 4 de este fruto (los más frecuentes son de calibre 4 y 5, los de calibre 3 entre 1,5 y 2,5 kg de peso no son tan frecuentes). Calculamos la superficie que ocupa el melón en la cinta como el equivalente de un circunferencia del mismo radio del melón: $A_{\text{melón}} = \pi * R^2 = \pi * 9^2 = 254,47 \text{ cm}^2 \approx 0,0255 \text{ m}^2/\text{melón}$

$$M \text{ (melones/s)} = (W, \text{ (m}^2\text{/s)} / 0,0255(\text{m}^2\text{/melón})) \quad \text{(ECUACIÓN 6)}$$

Sustituyendo en la ECUACIÓN 4 el valor de L (m) y de T (s) podemos despejar la velocidad de transporte de la cinta como:

- Para T1 (10 segundos): $Y = 5\text{m} / 10 \text{ s} = 0,5 \text{ m/s}$
- Para T2 (30 segundos): $Y = 5\text{m} / 30 \text{ s} = 0,167 \text{ m/s}$
- Para T3 (90 segundos): $Y = 5\text{m} / 90 \text{ s} = 0,056 \text{ m/s}$
- Para T4 (300 segundos): $Y = 5\text{m} / 300 \text{ s} = 0,0167 \text{ m/s}$

Con la ECUACIÓN 5 podemos despejar la capacidad de trabajo de la cinta:

- Para T1: $C = 0,5 \text{ m/s} * 1 \text{ m} = 0,5 \text{ m}^2\text{/s}$
- Para T2: $C = 0,167 \text{ m/s} * 1 \text{ m} = 0,167 \text{ m}^2\text{/s}$
- Para T2: $C = 0,056 \text{ m/s} * 1 \text{ m} = 0,056 \text{ m}^2\text{/s}$
- Para T4: $C = 0,0167 \text{ m/s} * 1 \text{ m} = 0,0167 \text{ m}^2\text{/s}$

Despejamos finalmente el número de melones en la ECUACIÓN 6:

- Para T1: $M = 0,5 \text{ m}^2/\text{s} / 0,0255 \text{ m}^2/\text{melón} = 19,61 \text{ melones/s}$
- Para T2: $M = 0,167 \text{ m}^2/\text{s} / 0,0255 \text{ m}^2/\text{melón} = 6,55 \text{ melones/s}$
- Para T2: $M = 0,056 \text{ m}^2/\text{s} / 0,0255 \text{ m}^2/\text{melón} = 2,2 \text{ melones/s}$
- Para T2: $M = 0,0167 \text{ m}^2/\text{s} / 0,0255 \text{ m}^2/\text{melón} = 0,65 \text{ melones/s}$

Si 1 melón pesa de media 1,25 kg, en 1.000 toneladas ($1 \cdot 10^6 \text{ kg}$) habrán 800.000 melones a tratar. El total de tiempo trabajado por el equipo será:

- Para T1: $T_t = 800.000 \text{ melones} / 19,61 \text{ melones/s} = 40.795,51 \text{ s} \approx \mathbf{12 \text{ h}}$
- Para T2: $T_t = 800.000 \text{ melones} / 6,55 \text{ melones/s} = 122.137,40 \text{ s} \approx \mathbf{34 \text{ h}}$
- Para T3: $T_t = 800.000 \text{ melones} / 2,2 \text{ melones/s} = 363.636,36 \text{ s} \approx \mathbf{102 \text{ h}}$
- Para T4: $T_t = 800.000 \text{ melones} / 0,65 \text{ melones/s} = 1.230.769,23 \text{ s} \approx \mathbf{342 \text{ h}}$

El equipo estará compuesto por 5 lámparas UV de 40W, por lo que tendrá un consumo de 0,2 kW a la hora en potencia eléctrica. Si lo multiplicamos por el coste del kWh para industria (0,092 €/kWh) obtenemos unos costes de funcionamiento anuales de:

- Para T1: $0,2 \text{ kW} \cdot 12 \text{ h} \cdot 0,092 \text{ €/ kWh} = \mathbf{0,22 \text{ €}}$
- Para T2: $0,2 \text{ kW} \cdot 34 \text{ h} \cdot 0,092 \text{ €/ kWh} = \mathbf{0,63 \text{ €}}$
- Para T3: $0,2 \text{ kW} \cdot 102 \text{ h} \cdot 0,092 \text{ €/ kWh} = \mathbf{1,88 \text{ €}}$
- Para T4: $0,2 \text{ kW} \cdot 342 \text{ h} \cdot 0,092 \text{ €/ kWh} = \mathbf{6,29 \text{ €}}$

Podemos observar que el gasto energético de las lámparas es despreciable. Igualmente, con el tiempo de funcionamiento calculado, la vida útil de estas excede los 20 años. Si suponemos que de todos los melones procesados en esta línea, un 5% se perderán por daños de *Fusarium* si estos no son tratados (ya sea durante el almacenado en las instalaciones de la empresa, o durante el transporte a los destinos), y que la mortalidad de *Fusarium* con el Tratamiento 1 es del 45%, con el Tratamiento 2 del 50%, con el Tratamiento 3 del 70% y con el Tratamiento 4 del 90% (aproximadamente, ponderada a partir de los resultados obtenidos en el Apartado 4 de este documento), la producción final vendida con éxito para cada tratamiento será de:

- T1: $1*10^6 - (1*10^6*0,05*(1-0,45)) = 972.500$ kg de producto final
- T2: $1*10^6 - (1*10^6*0,05*(1-0,5)) = 975.000$ kg de producto final
- T3: $1*10^6 - (1*10^6*0,05*(1-0,7)) = 985.000$ kg de producto final
- T4: $1*10^6 - (1*10^6*0,05*(1-0,9)) = 995.000$ kg de producto final

Hay que tener en cuenta que los valores de producto final vendido con éxito son distintos, pero en todos los tratamientos tendremos que procesar 1.000.000 kg de producto en cualquier caso, con los costes que ello conlleva. Si calculamos los valores de VAN y TIR para las siguientes posibles inversiones (Los cálculos se adjuntarán en el **Anexo III: Estudio económico**) teniendo en cuenta también los costes de personal del equipo, su gasto eléctrico y las estudiamos para un horizonte temporal de 20 años, obtenemos los siguientes resultados:

- Tratamiento 1: VAN = 1.106.995,60€ para 20 años, con un TIR del 122% y un periodo de retorno de 1 año, con 9.585,75€
- Tratamiento 2: VAN = 1.143.987,40€ con un TIR del 126% y un periodo de retorno de 1 año con 11.490,35 €
- Tratamiento 3: VAN = 1.291.962,40€ con un TIR del 141% y un periodo de retorno de 1 año con 19.111,06 €
- **Tratamiento 4: VAN = 1.439.874,20€ con un TIR del 156% y un periodo de retorno de 1 año con 26.728,52 €**

La opción más rentable y viable económicamente para esa cantidad de producción es implantar el Tratamiento 4. El consumo eléctrico y de personal asociado al equipo es relativamente bajo (aunque para este Tratamiento 4 el tiempo de trabajo sea 29 veces mayor que en el Tratamiento 1, por ejemplo) y las posibilidades de incrementar la producción, aunque son cifras que rondan entre el 4 y el 5%, hemos visto que pueden influir ostensiblemente en los insumos y beneficios obtenidos por la empresa.

6. CONCLUSIONES

Morfología y patogenicidad

Por norma general se suelen citar dos especies de *Fusarium* como principales patógenos del melón (*F. oxysporum* y *F. solani*). En el desarrollo de este trabajo se han conseguido aislar otras distintas a estas dos: *F. brachygibbosum*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. fujikuroi*, *F. longipes*, y *F. proliferatum*.

Cuando estas especies son aisladas en medios de cultivo sintéticos, como el Agar PDA, muestran características morfológicas muy distintas entre sí. Sin embargo, cuando se hallan parasitando al melón muestran caracteres muy similares. Igualmente, los daños que causan al fruto son prácticamente idénticos, por lo tanto, se puede descartar su sintomatología como elemento distintivo.

Experimento con radiación UV-C

El tratamiento con radiación ultravioleta C demostró ser muy eficaz. Cuanto mayor fue el tiempo de exposición de las muestras a esta radiación, mayor fue la mortalidad e inactivación de conidios. Para tratamientos de 90 y 300 segundos, con intensidades de 10,5 W/m², se consiguieron tasas de mortalidad mínimas del 70% y 85% respectivamente, rozando máximos de casi el 100% en algunas de las especies estudiadas para exposiciones de 300 segundos.

Además, se produjeron efectos secundarios en el desarrollo de todas las especies. Efectos tales, como la imposibilidad de desarrollar macroconidios o clamidosporas y formar exclusivamente microconidios en masa e hifas deformadas, así como un retraso en el crecimiento y expansión del micelio (disminución de la tasa de crecimiento y alargamiento del período de latencia). Esta deficiencia en el desarrollo podría hacer al hongo mucho más vulnerable frente a las defensas naturales del fruto y/u otros competidores.

Si bien este fue un experimento desarrollado *in vitro*, los resultados son muy prometedores. Sería muy interesante poder llevar a cabo este mismo experimento, pero irradiando material vegetal como frutos (*in vivo*) en vez de exclusivamente propágulos como esporas para comprobar si los resultados obtenidos son similares. De ser así, podría ser un método fungicida de tipo físico muy útil para aplicar en líneas de

procesado de melón para alargar la vida útil de estos y reducir sus podredumbres durante comercialización.

Supuesto de análisis económico y comparación de los distintos tratamientos estudiados

Aunque las pérdidas por pudrición ocasionadas por *Fusarium* en una empresa con un volumen de producción/procesado de melón moderado (1.000 toneladas por temporada o más) no sean superiores al 5%, la posibilidad de aumentar los beneficios reduciendo estas pérdidas a prácticamente el 0% hacen de la radiación UV-C un instrumento para la mejora económica de la empresa bastante útil.

La diferencia entre los costes de operación de un equipo UV-C para tratamientos de 300 segundos (11-12 W/m²) y otro para tratar 10, 30 o 90 segundos (misma dosis) es mínima, pero sin embargo, en horizontes temporales lejanos el incremento de beneficios anuales que se logra es superior cuanto mayor sea la duración del tratamiento (siempre que el equipo llevando a cabo ese tratamiento pueda operar al ritmo de producción de la empresa, evidentemente).

BIBLIOGRAFÍA

- BERNHARDT, E.; DODSON, J.; WATTERSON, J. (1985): Cucurbit Diseases, A Practical Guide for Seedsmen, Growers & Agricultural Advisors.
- BLANCARD, D.; LECCO, H.; PITRAT, M. (1992): Enfermedades de las Cucurbitáceas; Observar, Identificar, Luchar, pp. 219-220.
- GÓMEZ L., E.D. (2008): Caracterización de cepas toxigénicas del género *Fusarium* mediante técnicas de biología molecular, pp. 3-21.
- GÓMEZ V., J.; TELLO M., J.C. (2000): Presencia de la raza 1-2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. En: Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas, 26(1): 27 -33. Almería.
- KASIM, R.; KASIM, R.U. (2014): Biochemical and color changes of fresh-cut melon (*Cucumis melo* L. cv. Galia) treated with UV-C. Food Science and Technology, 34(3): 547-551.
- LAMIKANRA, O.; KUENEMAN, D.; UKUKU, D.; BETTGARBER, K.L. (2005): Effect of processing under ultraviolet light on the shelf life of fresh-cut Cantaloupe melon. Journal of Food Science, 70(9): 534- 539.
- LAMINKARA, O.; RICHARD, O.A.; PARKER, A. (2002): Ultraviolet induced stress response in fresh cut Cantaloupe. Phytochemistry, 60(1): 27-32.
- LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. (2006): The *Fusarium* Laboratory Manual, pp 3-13, 79-95 y 113-117.
- NELSON, P.E.; DIGNANI, M.C.; ANAISSIE, E.J. (1994): Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. Clinical Microbiological Review, 7(4): 479-504.
- NEWMAYER, D. (1990): Filtering small quantities of conidial suspensions to remove mycelial fragments. Fungal Genetics Reports, 37, Article 15.
- OUMOULOU, A.; EL-OTMANI, M.; CHIKH-ROUHO, H.; CLAVER, A.G.; TORRES, R.G.; PERLTREVES, R.; ÁLVAREZ, J.M. (2013): Breeding melon for resistance to Fusarium wilt: recent developments. Euphytica, 192(1): 155-157.
- RAEDER, U.; BRODA, P. (1985): Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology, 1(1): 17-20.
- ROTEM, J.; WOODING, B.; AYLOR, D.E. (1985): The Role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. Phytopathology, 75(1): 510-514.
- SEO, Y.; HO KIM, Y. (2017): Potential reasons for prevalence of Fusarium wilt in oriental melon in Korea. The Plant Pathology Journal, 33(3): 250-253.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. (2013) MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(1): 2725-2729.
- TURTOI, M. (2013): Ultraviolet light treatment of fresh fruits and vegetable surfaces: A review. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 19(3): 325-337.
- ZEMÁNKOVÁ, M.; LEBEDA, A. (2001): *Fusarium* species, their taxonomy, variability and significance in plant pathology. Plant Protection Science, 37(1): 35 -42.
- ZITTER, T.A.; HOPKINS, D.L.; THOMAS, C.E. (2004): Plagas y Enfermedades de las Cucurbitáceas.. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, 88 pp.

DOCUMENTO: ANEXOS

Contenido

Anexo I: Proceso de PCR.....	49
Anexo II: Fichas técnicas de especies identificadas.....	61
Anexo III: Estudio económico	79

Anexo I: Proceso de PCR

1. Extracción del ADN por medio del protocolo de Raeder & Broda

1) Se añade en un tubo Eppendorf 300 μ L de tampón Raeder & Broda, y con ayuda de un asa de siembra (debidamente esterilizada con alcohol y fuego) y mucho cuidado se raspa la superficie de las placas de Petri. Hay que evitar a todo coste arrastrar agar, puesto que este puede adulterar el contenido genético de la muestra. Se añadirá siempre que se pueda aproximadamente 1/4 de la superficie de micelio de una placa Petri de 9 cm de diámetro completamente cubierta de éste. Si el micelio fuera muy abundante, no raspar tanto con el asa de siembra porque si no la muestra tendrá demasiados sólidos en suspensión.

2) Machacar y triturar la mezcla con un émbolo azul (pistilo estéril) hasta que el micelio quede completamente diluido en el tampón y se observe cierta homogeneidad en la mezcla. Asegurarse bien de presionar la muestra con el émbolo contra las paredes y la punta del tubo Eppendorf pero evitando que se derrame el contenido del Eppendorf o se forme mucha espuma.

3) Se añaden 150 μ L de acetato sódico 3M pH 5,2 a la mezcla y se agita suavemente con la mano para mezclar.

4) La muestra se mete 10 minutos en el congelador a -20°C.

5) Centrifugar la muestra 10 minutos a 13.000 rpm. Al usar la centrifugadora hay que tener extremo cuidado en colocar las muestras de una manera equilibrada (siempre colocar las muestras en lugares opuestos de la centrifugadora procurando que entre 2 grupos de muestras queden siempre a izquierda y derecha el mismo número de espacios sin usar. Nunca ha de ponerse sólo una muestra, si se diese este caso, poner en el lado opuesto otro Eppendorf relleno con agua con una cantidad aproximada al nuestro) y de asegurarse que la

velocidad de giro esté programada en las unidades que nos interesa. Además, hay que colocar las bisagras de las tapas de los tubos de mirando hacia arriba para que los sólidos indeseados del micelio se solidifiquen y acumulen de tal manera que se facilite el siguiente paso de extracción del sobrenadante.

6) Recoger el sobrenadante del paso anterior con pipeta (aproximadamente unos 350 μ L) y mucho cuidado de no recoger los sólidos depositados en el fondo del Eppendorf y pasarlos a un Eppendorf limpio.

7) Se añade el mismo volumen de isopropanol que de sobrenadante recogido de manera aproximada (como en el paso anterior tendremos la pipeta calibrada a un determinado volumen, podemos estimar de forma aproximada cuanto volumen de sobrenadante se recogió). Se agita suavemente con la mano y debería comenzar a apreciarse la formación de las espiras de ADN. Éstas son más turbias y translúcidas que el resto del líquido.

8) Dejar la muestra reposar unos 5 minutos a temperatura ambiente.

9) Centrifugar la muestra 15 minutos a 12.000 rpm.

10) Después del proceso de centrifugado se habrá formado un pellet sólido muy pequeño en el fondo del Eppendorf. Este pellet es el ADN que nos interesa obtener, así que desechamos el sobrenadante con mucho cuidado de no perder dicho pellet. Si el pellet ha solidificado bien, se podrá volcar con mucho cuidado el Eppendorf hasta deshacernos de la mayoría del sobrenadante y el resto retirarlo con mucho cuidado con una pipeta con la punta más fina que haya. La punta de la pipeta se apoyará en la pared del Eppendorf opuesta a aquella en la que el pellet se ha depositado (dado que en los procesos de centrifugado, los sólidos siempre se depositan lateralmente) y se irá extrayendo el sobrenadante por ahí. Si se diera el caso de que el pellet no fuera lo suficientemente sólido, el sobrenadante se extraería

completamente con pipeta y sumo cuidado. Éste se descarta en un vaso de precipitados.

11) Añadir sobre el pellet unos 50 μL de etanol al 70%, asegurándose de que el etanol cubre completamente el pellet.

12) Centrifugar la muestra 15 minutos a 12.000 rpm.

13) Recoger el etanol de lavado con una pipeta con mucho cuidado de no coger nada de pellet procediendo con la pipeta como se hizo en el apartado 10. Si quedan algunas gotas en el fondo del Eppendorf que no se pueden arriesgar a extraer sin llevarse parte del pellet no pasa nada, en el siguiente paso se evaporará dicho etanol.

14) Secar los pellets en la campana de vacío, previamente programada sin ninguna temperatura (temperatura ambiente), presión de vacío de 10 atmósferas y la hacemos funcionar unos 15 minutos con el método manual (“manual run”). Los Eppendorf que introduzcamos en la máquina se dejarán con la tapa abierta para que el vacío surta efecto.

15) Una vez secados completamente nuestros pellets, les añadimos aproximadamente 30 μL de agua Mili-Q estéril (agua libre de ADN-asas). Si el tamaño del pellet fuese mayor, puede añadirse más agua Mili-Q estéril. Una vez añadida el agua, agitar un poco con el vórtex para que el ADN se disuelva bien en el agua y centrifugar un instante nada más para que se deposite todo en el fondo del Eppendorf. Se dejan reposar las muestras media hora al menos.

16) Guardar las muestras en el frigorífico.

2. Análisis del contenido de ADN mediante el equipo de Nanodrop

1) Conectamos espectrofotómetro Nanodrop al ordenador (en el caso de que éste estuviera desconectado).

2) Pipeteamos 1 μL de agua Mili-Q estéril en el medidor para limpiarlo de restos de posibles mediciones anteriores.

3) Abrimos el software de Nanodrop, seleccionando el usuario 'PRODUCCIÓN VEGETAL' y seleccionando el tipo de medición que vamos a llevar a cabo, en nuestro caso 'NUCLEIC ACIDS' (ADN).

4) Automáticamente el programa realizará un protocolo de autocalibrado.

5) Una vez aparezca la pantalla de mediciones, arriba a la derecha cambiamos el nombre de la medición a nuestro gusto (fecha, tipo de muestra, etc.). Volvemos a cargar 1 μL de agua Mili-Q estéril y le damos a la opción 'BLANK' y luego a 'MEASURE' (previamente la opción 'MEASURE' no estaba disponible). Con esto obtenemos el análisis de la muestra testigo con la que se compararán nuestras muestras de ADN

6) Pipeteamos 1 μL de agua Mili-Q estéril para limpiar el medidor y pipeteamos 1 μL de nuestra muestra de ADN. Volvemos a cambiar arriba a la derecha el nombre, en este caso ponemos qué muestra es (suponiendo que se vayan a medir más de 1 muestra).

7) Le damos a 'MEASURE' y cuando acabemos, volvemos a limpiar el cabezal y repetimos el paso 6 y 7 tantas veces como muestras tengamos.

8) Una vez hayamos medido todas nuestras muestras, pipeteamos 2 μL de agua Mili-Q estéril para limpiar el cabezal de medición.

9) Pulsamos la opción 'EXPORT' para transformar todas las mediciones realizadas en un fichero de formato ".xml" que luego convertiremos a formato Excel y poder con ello manejar los datos en cómodas tablas. Si las muestras que hemos analizado han dado unos valores de concentración de ADN aceptables, y una calidad buena de éste, pasaremos a la siguiente etapa. Si las concentraciones de ADN son

muy elevadas, se realizarán diluciones (100µL/mL, 1:10, 1:50...etc.). En el caso de que las concentraciones sean muy bajas o la calidad del ADN sea muy pobre, se tendrá que realizar la extracción de ADN de nuevo.

3. Preparación de la cubeta y cámara de electroforesis

1) Se prepara el gel de agarosa al 1,5%. Hay que tener en cuenta el número de muestras que queremos correr en el gel. Si el número de muestras es inferior a 15 (los peines suelen ser de 16 cerdas, y al menos 1 cerda hay que reservarla para una muestra de testigo) se empleará un único peine en 1 cubeta de electroforesis. El gel de agarosa se forma con 90 mL de TBE 1X y la cantidad proporcional de agarosa, que en este caso se tratan de 1,35 g. Se juntan ambos componentes en un matraz.

2) Calentar la mezcla en el microondas, inicialmente unos 4 minutos a 400 W y si fuera preciso, luego un poco más hasta que quede todo bien diluido y no se observen hebras translúcidas en suspensión en el fluido.

3) Enfriar la muestra a temperatura ambiente o si existe urgencia, en agua. En este último caso asegurarse de que el agua entre en contacto con el matraz de forma homogénea para que no solidifique el gel antes de tiempo.

4) Una vez enfriado el gel de modo que se pueda agarrar el matraz con la mano sin quemarte, se añaden 4,5 µL de bromuro de Etidio (con sumo cuidado puesto que este componente es muy tóxico) y se agita suavemente la mezcla con la mano hasta que quede todo homogeneizado. Hay que añadirlo cuando el gel esté templado para evitar sus nocivos vapores.

5) Se prepara la cubeta de electroforesis para el vertido del gel. Para ello se cierra su perímetro puesto que 2 de sus 4 laterales están abiertos. Se utiliza para ello unas piezas de plástico negro destinadas a tal uso y cinta adhesiva. De esta manera, la cubeta de electroforesis adquiere forma de caja abierta por arriba. Hay que

asegurarse de que no hay resquicios en la base puesto que el gel se verterá en el interior de la cubeta y no puede ni debe derramarse.

6) Se coloca el peine en las ranuras de la cubeta, en vertical y sobre las líneas de color. Hay que asegurarse de que no toque del todo el fondo de la cubeta. Tiene que quedar un espacio de unos 3-4 mm aproximadamente.

7) Se vierte el gel de agarosa en la cubeta (con decisión, y desde una esquina) y se deja que solidifique durante unos 15 minutos. Una vez solidifique el gel, se extrae el peine, que con sus cerdas deja unos pocillos y se recorta el gel sobrante con un escalpelo o bisturí.

8) Se coloca la cubeta de electroforesis en la cámara de electroforesis con el gel debidamente solidificado y se cubre con TBE 1X toda la cámara de modo que quede una capa de unos 3-4 mm por encima del gel solidificado.

9) Se rellenan los pocillos. Para ello se pipetea gotas de 1 μ L de un tampón colorante (tampón de carga) sobre una lámina de parafilm (Se pipetea una gota por cada muestra, dejando espacio de sobra entre gota y gota) y sobre cada gota se pipetea 3 μ L de la/s muestra/s. Con la misma pipeta se mezcla el tampón con la muestra (cambiando cabezal de pipeta entre muestra y muestra) y con mucho cuidado se vierte en la vertical de cada pocillo, atravesando ligeramente la capa de TBE 1X. No es necesario que la punta de la pipeta llegue hasta el mismo pocillo, pues por gravedad acaba atravesando la muestra tamponada el TBE 1X y se deposita en el pocillo por sí sola. Se rellenan tantos pocillos como muestras se tengan, recordando siempre dejar 1 pocillo para la muestra testigo (testigo Laddes: marcador de peso molecular Gene Ruler 1 Kb).

10) Se conectan el cable rojo de la cámara de electroforesis con el polo rojo y el cable negro con el polo negro. Se programa la cámara a 80 V, 400 mA (por

defecto) y para un tiempo de trabajo de 40/60 minutos (dependiendo si la electroforesis se realiza para una extracción del ADN o para una PCR). Por último, se le da a comenzar el proceso y comprobamos que se desplazan burbujas a través del TBE 1X (indicativo de que el proceso se está llevando a cabo debidamente porque existe un diferencial de potencial eléctrico entre los polos).

11) Una vez pasado el tiempo, desconectar la máquina y extraer el gel con cuidado para pasar a la siguiente etapa.

4. Visualización del gel con el programa Vision Capt.

1) Como la cámara transiluminadora está siempre conectada al ordenador, encendemos los dos interruptores de la parte inferior de ésta.

2) Abrimos el software de Vision Capt.

3) Introducimos el gel recién salido de la electroforesis, con mucho cuidado y procurando que no queden burbujas de aire bajo éste.

4) Conectamos la luz blanca de la cámara, y dejando la puerta de esta entreabierta, seleccionamos la opción 'LIVE PREVIEW' del software. Con esto podemos comprobar que nuestro gel queda bien centrado en el área de toma de fotografía de la cámara.

5) Una vez comprobado que el gel está bien centrado, detenemos la opción 'LIVE PREVIEW', desconectamos la luz blanca y cerramos la puerta de la cámara.

6) Se programa el tiempo de exposición a 960 msec.

7) Conectamos la luz roja de Transiluminator.

8) Seleccionamos la opción 'EXPOSURE TIME' y en cuanto salga la imagen damos rápidamente a 'FREEZE' y desconectamos rápidamente la luz roja de Transiluminator.

9) Presionamos en 'AREA TO SAVE', centramos la imagen a nuestro gusto y le damos a 'SAVE'. Una vez hemos comprobado que la imagen se ha guardado correctamente, imprimimos en color negativo y cerramos el software.

10) Retiramos el gel de la cámara, lo tiramos y limpiamos bien la cámara con alcohol. En el caso de que alguna muestra a pesar de haber pasado satisfactoriamente las mediciones del Nanodrop, diera un resultado negativo o inconcluyente en el gel de electroforesis y su fotografía inmediatamente posterior con el software Vision Capt., habrá de probarse a otras diluciones distintas o repetir desde el principio, extrayendo de nuevos su ADN.

5. Preparación de la PCR

1) Se coge una caja isotérmica y se rellena de hielo picado. En el hielo depositamos los Eppendorf con los siguientes reactivos que emplearemos en la mezcla maestra o MIX de la PCR y que tienen que descongelarse: Buffer, MgCl₂, DNTPs y los primers ITS₁ e ITS₄. La Taq. Horse Power, que es el último reactivo del MIX no es necesario ponerlo a descongelar puesto que incluso estando en el congelador se encuentra en estado líquido.

2) Sacamos nuestras muestras del frigorífico y las pasamos brevemente por el vórtex y el spinner para homogeneizarlas. Las devolvemos otra vez al frigorífico.

3) Si los reactivos del MIX tardan en descongelarse pueden pasarse por el vórtex también para agilizar el proceso.

4) Elegir qué tipo de MIX se va a realizar. Hay que tener en cuenta que el Biorad se cargará con Eppendorf con 30 µL, así que las combinaciones de MIX + ADN que carguemos no pueden superar esta cantidad. Las combinaciones más utilizadas son 29 µL de MIX + 1 µL de ADN y/o 28 µL de MIX + 2 µL de ADN.

En nuestro caso emplearemos mayoritariamente la segunda (28 + 2). La formulación del MIX seguiría el siguiente modelo para un MIX de 28 + 2:

[Stock]	[Work]	[1x]	[Reactivo]	[Nx]
/	/	13.3	H ₂ O sdd.	Nx(1x)
10x	1x	3	Buffer	Nx(1x)
25 mM	2.5 mM	3	MgCl ₂	Nx(1x)
2.5 mM	0.2 mM	2.4	DNTPs	Nx(1x)
5 μM	0.5 μM	3	ITS ₁	Nx(1x)
5 μM	0.5 μM	3	ITS ₄	Nx(1x)
5 U/ μL	1.5 U/ μL	0.3	Taq. Horse Power	Nx(1x)
Σ	/	28 μL de MIX	/	Nx(Σ (1x))

La columna de [Nx] es la columna del número de Eppendorf a las que tenemos que realizar la PCR. Para calcular las cantidades del MIX total simplemente multiplicamos las cantidades usadas para 1 Eppendorf (columna de [1x]) por el número de tubos totales (N).

El número de tubos (N) se obtiene multiplicando por 3 las muestras de ADN a las que queremos realizar la PCR (puesto que se hace por triplicado), sumando 2 (tenemos que poner un control negativo de H₂O sdd. y un control positivo para hongos y levaduras) y sumando 2 más de emergencia (en caso de que surja algún problema al pipetear en alguno de los tubos y haya que repetir el pipeteado de MIX).

Por ejemplo, si se tienen 4 muestras a las que se quiere practicar PCR, habría que preparar: $N = 4 \times 3 + 2 + 2 = \text{MIX para 16 tubos} \rightarrow N = 16$.

5) En una gradilla se colocan tantos Eppendorf de 0,2 mL como tubos se calcularon en el apartado anterior y se rotulan debidamente (Poniendo la fecha al primero y el último). Se coloca la rejilla en el hielo.

6) Una vez los reactivos se han descongelado y se tiene decidido qué MIX usar y en qué cantidades, vamos rellenando un Eppendorf de 1 mL con todas las cantidades de cada reactivo de la columna [Nx] en el orden que vienen en la tabla.

Realizar este proceso en el hielo para que los reactivos no comiencen a reaccionar.

Obtenemos así nuestro MIX.

7) Encender el termociclador Biorad 1 para que se vaya calentando y esté listo cuando tengamos los Eppendorf cargados con el MIX y el ADN.

8) Pasamos el Eppendorf con el MIX rápidamente por el vórtex y el spinner para homogeneizarlo y sacamos las muestras de ADN del frigorífico.

9) Llenamos los eppendorf en el siguiente orden:

❖ Control negativo (añadimos los 28 μL de MIX y 2 μL de H_2O sdd.).

❖ Añadimos los 28 μL de MIX a todos los demás Eppendorf.

❖ Añadimos los 2 μL de ADN a cada uno de los Eppendorf correspondientes.

❖ Añadimos los 2 μL de control positivo al Eppendorf de control positivo.

10) Pasar todos los Eppendorf de PCR por el vórtex y el spinner. Devolver los reactivos al congelador y las muestras al frigorífico.

11) Introducimos los Eppendorf en la rejilla del Biorad 1 (previamente calentado) y llevamos a cabo el programa ITS 56 HONGOS (para análisis de la región ITS del ADN ribosómico), el cual dura más de 3 horas. Antes de darle a iniciar el programa, comprobamos que el protocolo es correcto y no ha sido alterado.

12) Cuando el termociclador acabe su programa, guardar los tubos en el frigorífico. También se pueden dejar en el mismo termociclador porque al acabar el programa mantiene una temperatura de 4°C .

6. Prueba de electroforesis posterior a PCR

1) Una vez terminada la PCR, se vuelve a preparar un gel de electroforesis para las muestras de PCR de MIX + ADN. Para ello se repiten los procedimientos 3

(preparación de la cámara y cubeta de electroforesis) y 4 (visualización del gel con el programa Vision Capt.) descritos anteriormente, con la salvedad de que, en este caso, la cubeta de electroforesis tiene que correr el gel durante una hora (60 minutos) y no 40 minutos como en el caso posterior al uso del software de Nanodrop.

7. Purificación del ADN

1) Se añade etanol del 96-100% al WASH BUFFER (W1) e isopropanol al BINDING BUFFER (B2) según las indicaciones de las etiquetas de cada envase.

2) De BINDING BUFFER (B2) se añade 4 veces el volumen de la PCR (Si para cargar el gel post PCR empleamos 3 μ L, en el tubo de la PCR nos quedarán 27 μ L y por lo tanto se necesitarán 108 μ L de B2 al Eppendorf de la PCR.

3) Mezclar bien pipeteando y se pasa todo a una columna Clean-Up Spin + Wash Tube.

4) Centrifugar a 10 000g durante 1 minuto. Tirar el líquido que ha caído al Wash Tube.

5) Colocar de nuevo la columna dentro del Wash Tube y añadir 650 μ L de WASH BUFFER (W1).

6) Centrifugar a 10 000 g durante 1 minuto. Tirar el líquido que ha caído al Wash Tube.

7) Poner la columna dentro del Wash Tube. Centrifugar a máxima velocidad durante 1,5 minutos. Girar el tubo 180° y volver a centrifugar a velocidad máxima durante 1,5 minutos para secar la columna.

8) Pasar la columna al Recovery Tube y añadir 24 μ L de H₂O sdd. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.

9) Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.

10) Guardar a -20°C en el congelador.

8. Secuenciación genética de las muestras, cotejo con el banco de ADN central y envío de resultados.

Anexo II: Fichas técnicas de especies identificadas

Fusarium brachygibbosum

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS EXTERNAS

El micelio que se desarrolla en el agar otorga al medio de cultivo un **color** marrón terroso u ocráceo en el anverso de la/s colonia/s (Figura 1.A). El reverso adquiere un tono aún más oscuro. Aparecen pequeñas islas de micelio aéreo algodonoso de color blanco que se desarrollan aleatoriamente por la superficie. A veces estas islas de micelio presentan un halo rosado o amarillo en la periferia o pequeñas manchas de estas mismas tonalidades.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL MICELIO

Las **hifas** son hialinas, presentan tabiques y abundantes ramificaciones y pueden alcanzar grosores máximos de hasta 5 μm (Figura 1.D).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

En los extremos de las hifas aparecen con frecuencias **clamidosporas** hialinas (Figura 1.B) de entre 7,5 y 12,5 μm de diámetro. Éstas llegan a aparecer incluso en parejas (Figura 1.C), pero no es lo más habitual, al igual que no parecen producir clamidosporas intercalares. Esta especie produce una elevada cantidad de **macroconidios** fusiformes de entre 20 - 32,5 μm de longitud y 3,75 – 5 μm de anchura, hialinos y septados. Normalmente suelen presentar entre 1 y 4 tabiques. También es frecuente encontrar dichos macroconidios aún sin madurar con formas rectangulares y alargadas, sin septar o con 1 o 2 tabiques a lo sumo y tamaños que alcanzan como mucho 10 – 12,5 μm de longitud y 2,5 μm de anchura (Figura 1.E). A estos macroconidios sin madurar también se les puede llamar mesoconidios. Al microscopio también es frecuente encontrar fíalides y macroconidios aún unidos a las hifas listos para ser liberados al medio (Figura 1.F).

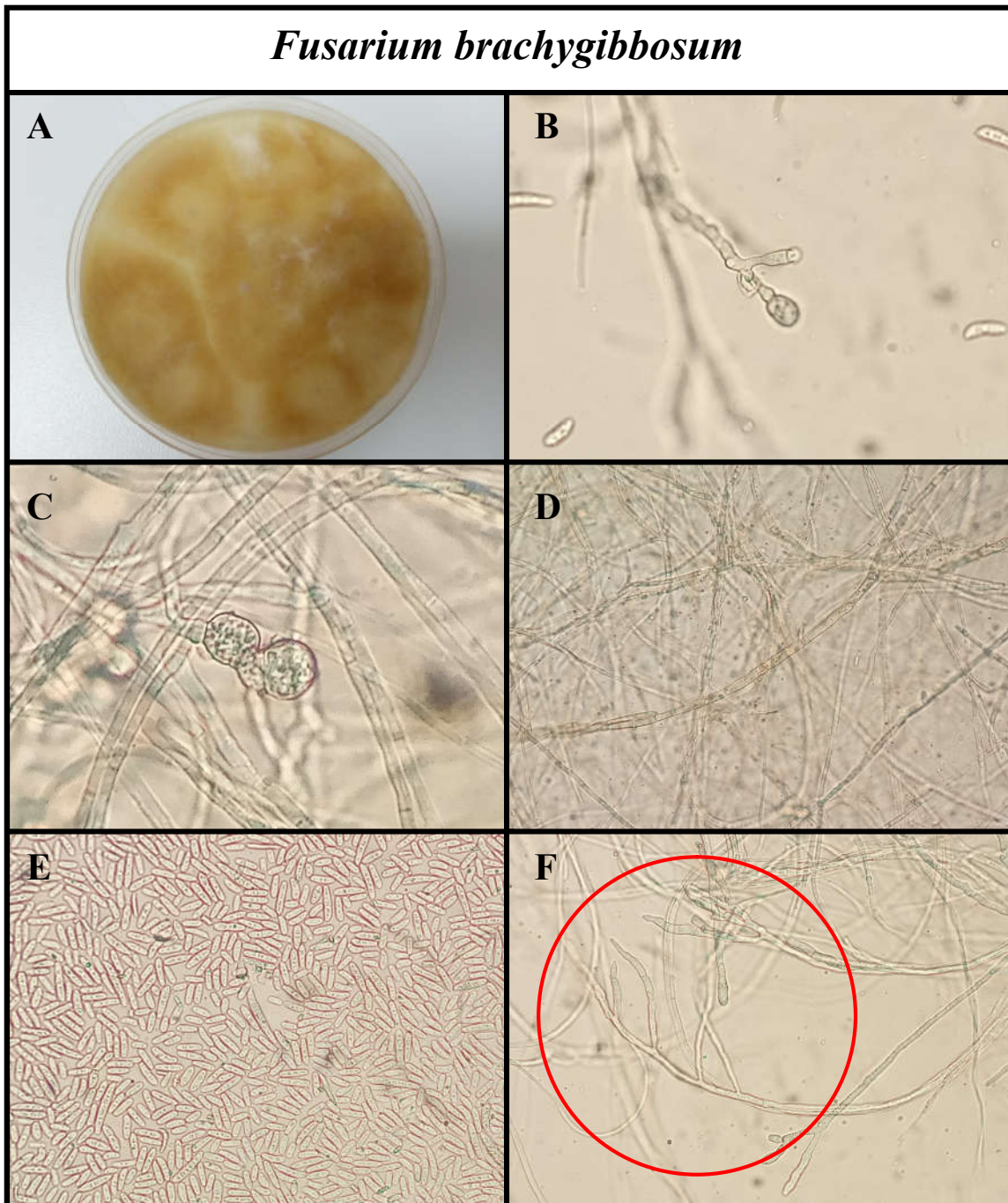


Figura 1 anexo. Cultivo de *Fusarium brachygibbosum* en medio agar PDA con estreptomina (A). Detalles microscópicos de sus clamidosporas terminales rugosas aisladas (B) y en parejas (C), los tabiques y ramificaciones de sus hifas (D), sus macroconidios tanto maduros como inmaduros (E) y fiálides (F). (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Fuente: elaboración propia).

Fusarium chlamydosporum

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS EXTERNAS

El micelio que se desarrolla en el agar otorga al medio de cultivo un **color** rosa salmón claro en el anverso de la/s colonia/s (Figura 2.A). Los núcleos de las colonias presentan un tono más oscuro. Produce un micelio aéreo blanco y algodonoso moderadamente abundante que puede tener una muy leve pigmentación rosada.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL MICELIO

Las **hifas** son hialinas, presentan tabiques y ramificaciones. Pueden alcanzar grosores máximos de hasta 3,75 - 5 μm . Excepcionalmente pueden presentar engrosamientos que aumentan su grosor hasta 8,75 μm , aunque no es muy frecuente. (Figura 2.C).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

Suelen aparecer **clamidosporas** hialinas de entre 6,25 – 10 μm de diámetro tanto terminales como intercalares. Generalmente éstas aparecen aisladas, aunque no es extraño que aparezcan también en racimos de hasta 3 – 4 clamidosporas (Figura 2.B).

Esta especie produce una elevada cantidad de **macroconidios** fusiformes de entre 20 - 30 μm de longitud y 3,75 – 5 μm de anchura, hialinos y septados. Suelen presentar entre 1 y 3 tabiques. Aparecen también macroconidios aún sin madurar (o mesoconidios), baciliformes, ovalados e incluso esféricos (posiblemente clamidosporas que se hayan desprendido), sin septar como norma general, hialinos también y con tamaños que alcanzan como mucho 7,5 - 10 μm de longitud y 2,5 μm de anchura (Figura 2.D).

Fusarium chlamydosporum

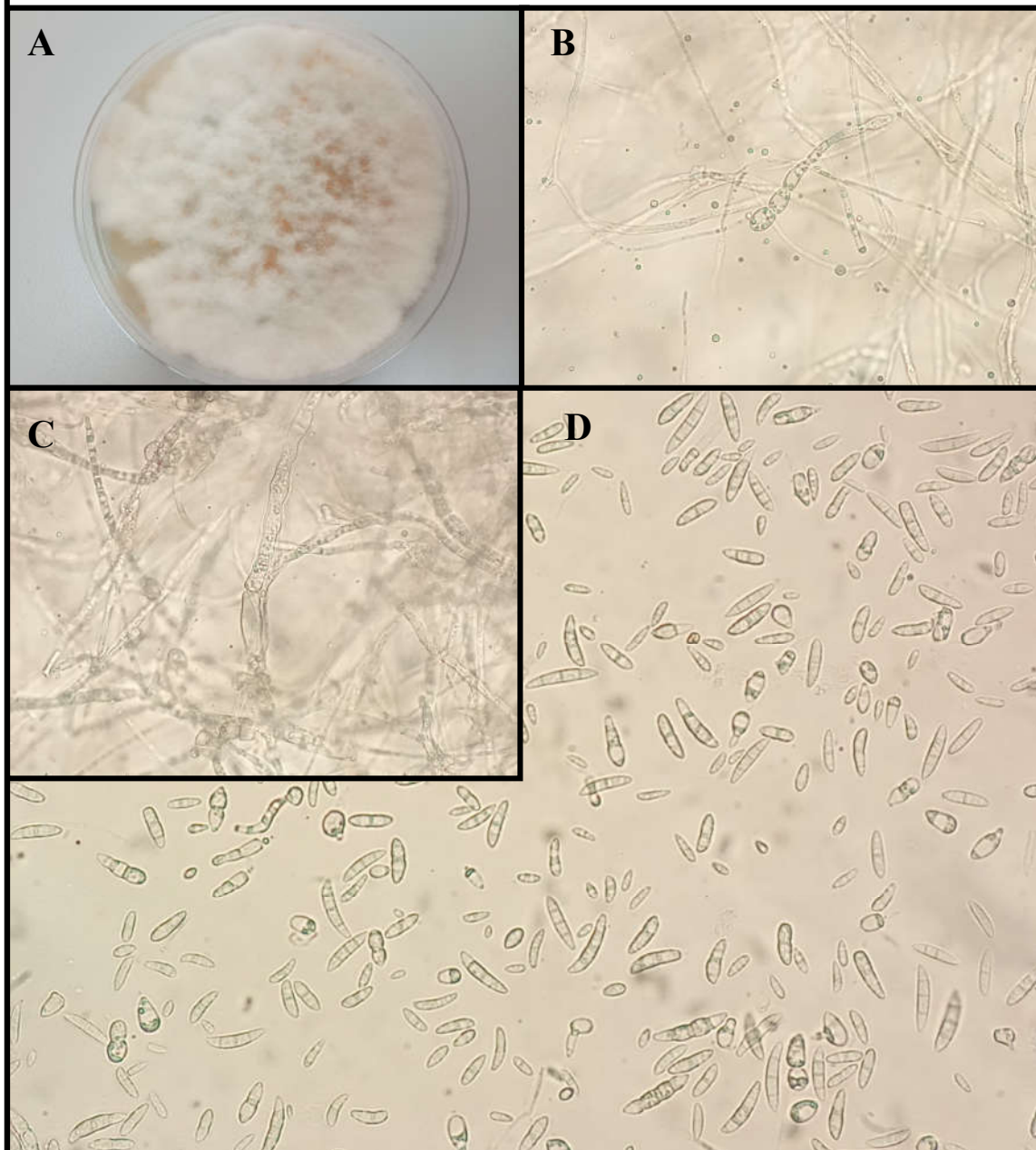


Figura 2 anexo. Cultivo de *Fusarium chlamydosporum* en medio agar PDA con estreptomicina (A). Detalles microscópicos de un racimo de clamidosporas terminales (B), una hifa engrosada (C) y sus macroconidios tabicados tanto maduros como inmaduros y algunas clamidosporas que se han desprendido (D). (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena Fuente: elaboración propia).

Fusarium equiseti

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS EXTERNAS

El micelio que se desarrolla en el agar otorga al medio de cultivo un **color** rosa salmón claro en el anverso de la/s colonia/s (Figura 3.A). Los núcleos de las colonias presentan un tono más oscuro en el reverso. El micelio aéreo es blanco y algodonoso, moderadamente abundante y puede tener una muy tenue y leve pigmentación rosada.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL MICELIO

Las **hifas** son hialinas, presentan tabiques y ramificaciones. Pueden alcanzar grosores máximos de hasta 3,75 - 5 μm . (Figura 3.B).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

Suelen aparecer **clamidosporas** hialinas de entre 6,25 – 7,5 μm de diámetro. Generalmente éstas aparecen aisladas, pero pueden llegar a aparecer intercaladas en las hifas (Figura 3.B).

Esta especie produce una elevada cantidad de **macroconidios** fusiformes de entre 20 - 30 μm de longitud y 3,75 – 5 μm de anchura, hialinos y septados. Suelen presentar entre 1 y 3 tabiques. Aparecen también macroconidios aún sin madurar (o mesoconidios), baciliformes, ovalados e incluso esféricos (posiblemente clamidosporas que se hayan desprendido), sin septar como norma general, hialinos también y con tamaños que alcanzan como mucho 7,5 - 10 μm de longitud y 2,5 μm de anchura (Figura 3.C).

Fusarium equiseti

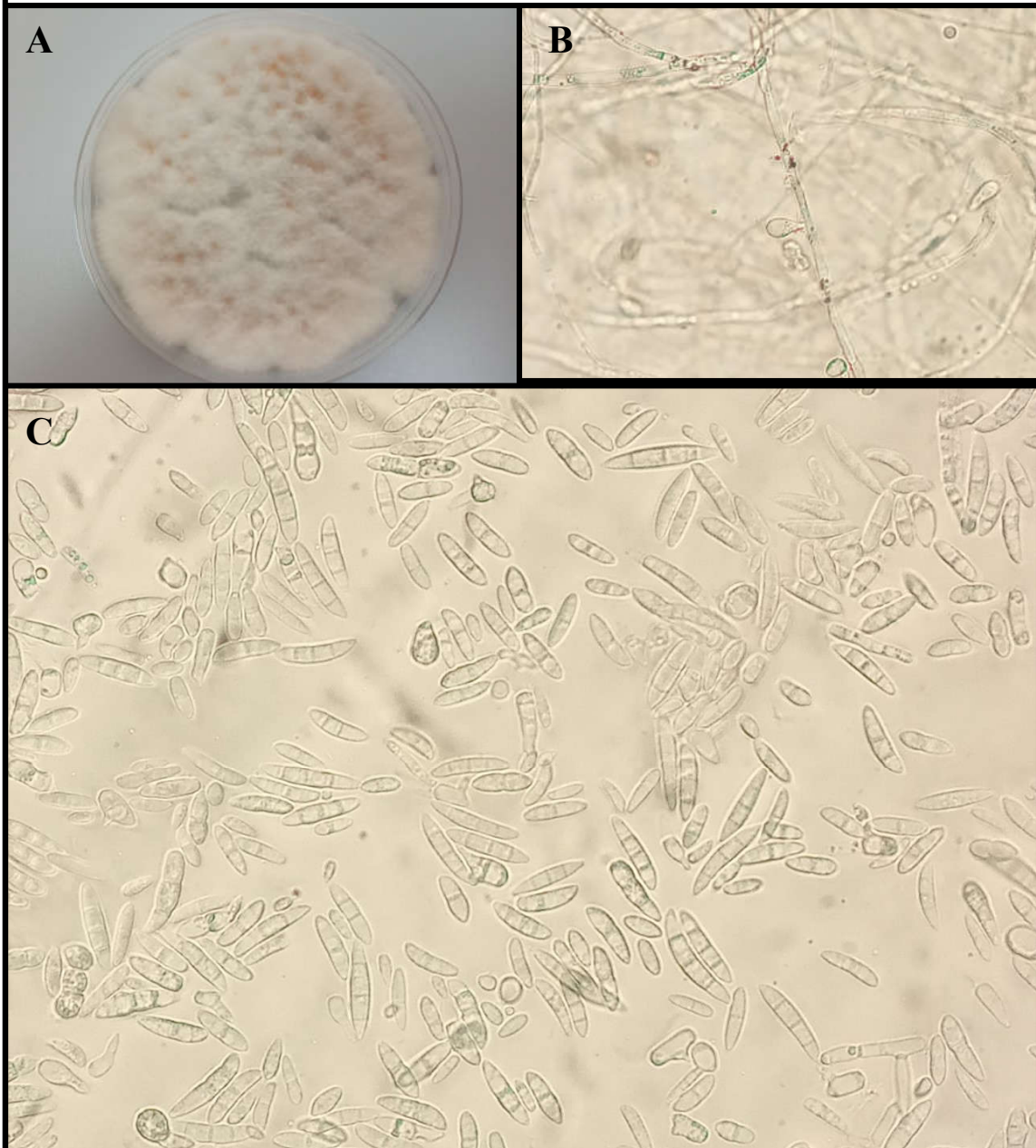


Figura 3 anexo. Cultivo de *Fusarium equiseti* en medio agar PDA con estreptomicina (A). Detalles microscópicos de una clamidospora intercalar axial en una hifa (B) y sus macroconidios tabicados tanto maduros como inmaduros y algunas clamidosporas que se han desprendido (C). (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Fuente: elaboración propia).

Fusarium fujikuroi

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS EXTERNAS

El micelio que se desarrolla en el agar otorga al medio de cultivo un **color** granate claro en el anverso de la/s colonia/s (Figura 4.A). Los núcleos de las colonias presentan un tono más oscuro en el reverso. Esta especie desarrolla un micelio aéreo blanco y algodonoso muy abundante, casi lanudo que puede tener una muy leve pigmentación granate.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL MICELIO

Las **hifas** son hialinas y ramificadas, pero aparentemente no presentan tabiques. Pueden alcanzar grosores máximos de hasta 5 – 6,25 μm . Presentan algunos engrosamientos. (Figura 4.C).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

No se aprecian **clamidoporas**.

Esta especie produce una pequeña cantidad de **macroconidios** fusiformes de entre 25 - 30 μm de longitud y 3,75 – 5 μm de anchura, hialinos y sin septar. La escasez de estos los hace poco o nada representativos (Figura 4.B).

Sin embargo, la presencia de **microconidios** en esta especie es muy elevada. Estos son generalmente baciliformes, ovalados y rectangulares, hialinos y no están septados. Alcanzan longitudes máximas de 10 – 12,5 μm y 3,75 – 5 μm de anchura (Figura 4.D).

En preparaciones para el microscopio es muy fácil de observar **fiálides** en las hifas. En algunos casos se puede hasta contemplar los fialoconidios (Figura 4.C)

Fusarium fujikuroi

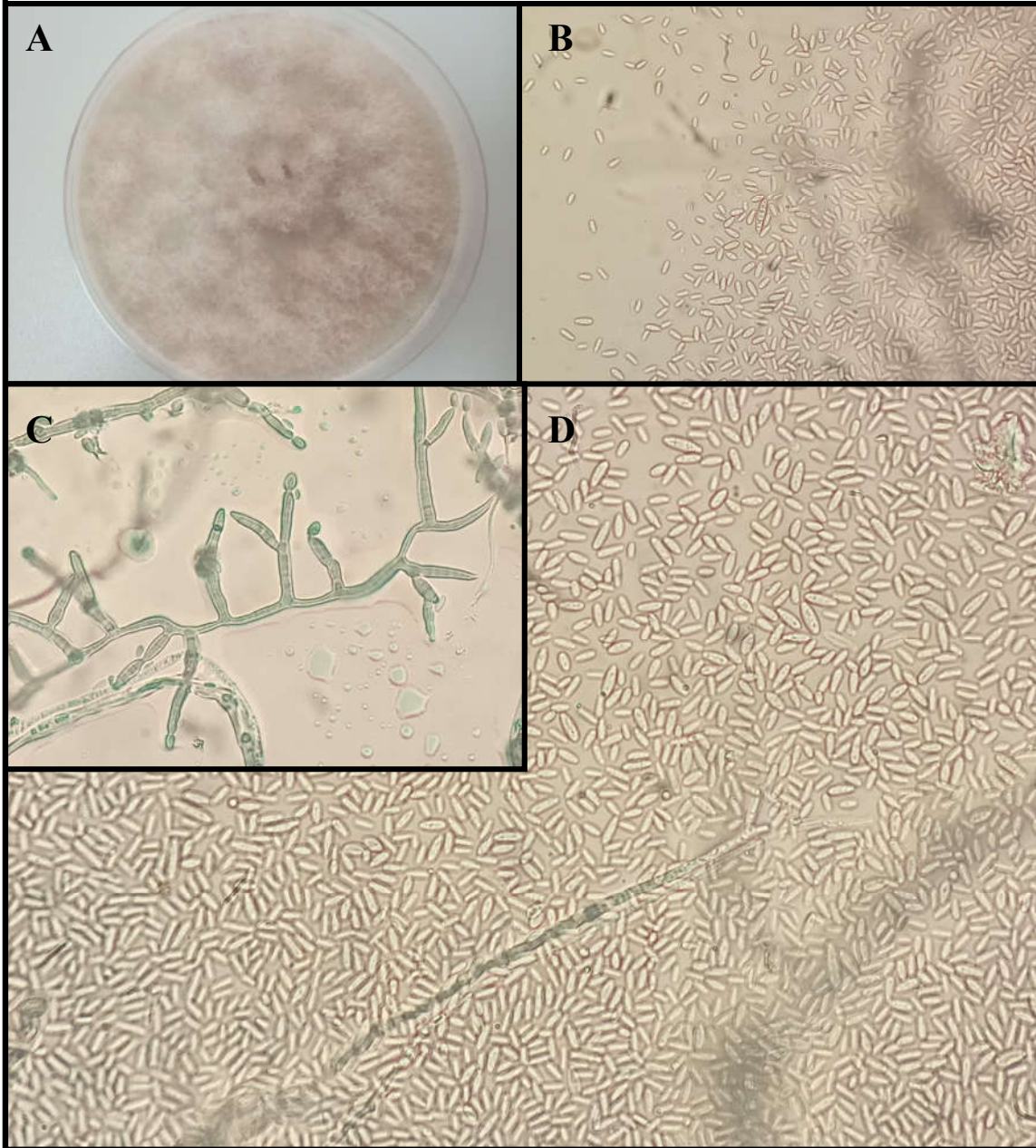


Figura 4 anexo. Cultivo de *Fusarium fujikuroi* en medio agar PDA con estreptomicina (A). Detalles al microscopio de un par de macroconidios inmersos en una multitud de microconidios (B), las hifas y un conjunto de fiálides en las que aún se pueden apreciar los fialoconidios unidos a ella (C) y la abundancia de microconidios (D). (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Fuente: elaboración propia).

Fusarium longipes

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS EXTERNAS

El micelio que se desarrolla en el agar otorga al medio de cultivo un **color** marrón ocre en el anverso de la/s colonia/s (Figura 5.A). El reverso de la/s colonia/s presenta un tono más oscuro. Esta especie desarrolla un micelio aéreo blanco con ligeras pigmentaciones ocre y amarillo claro. Es algodonoso, denso y se desarrolla aleatoriamente cubriendo parte de la superficie del medio de cultivo formando islas.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL MICELIO

Las **hifas** son hialinas, tabicadas y ramificadas. Pueden alcanzar grosores máximos de hasta 5 μm . (Figura 5.B y 5.C).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

Son muy abundantes las **clamidosporas**, tanto hialinas como pigmentadas de un ligero color ocre (esto último puede deberse a que se traten de clamidosporas de doble pared) que muy posiblemente sea la causa del color del micelio de las colonias. Tienen diámetros en torno a 7,5 – 12,5 μm , aparecen tanto terminales como intercalares, en solitario, en pareja y en racimos (Figura 5.B y 5.C).

Esta especie apenas produce estructuras reproductivas. La presencia de **macroconidios** es casi despreciable. Éstos son fusiformes, hialinos, septados (pueden tener hasta 5 tabiques) y alcanzan longitudes máximas de 30 μm y anchuras de 6,25 μm (Figura 5.E y 5.F).

Pueden apreciarse en algunos casos **fiálides** en los extremos de las hifas (Figura 5.D).

Fusarium longipes

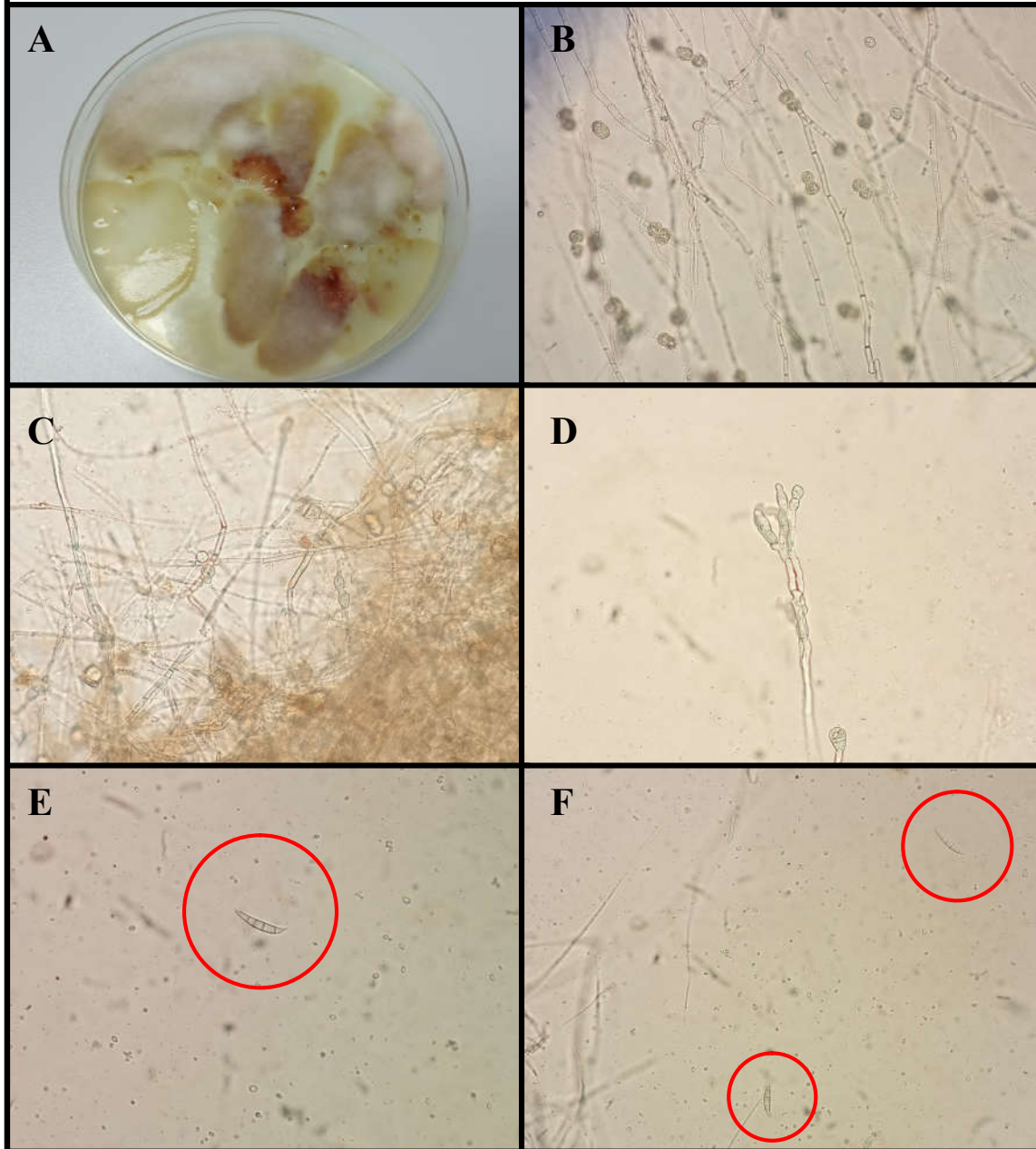


Figura 5 anexo. Cultivo de *Fusarium longipes* en medio agar PDA con estreptomycin compitiendo con una colonia de bacterias, a pesar del antibiótico(A). Detalles microscópicos de sus hifas (B), racimos de clamidosporas (B) y (C), unas fialides en el extremo de una hifa (D) y sus escasos macroconidios (E) y (F). (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Fuente: elaboración propia).

Fusarium oxysporum

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS EXTERNAS

El micelio que se desarrolla en el agar otorga al medio de cultivo un **color** marrón ocre con una ligera tonalidad color óxido en el anverso de la/s colonia/s (Figura 6.A). El reverso de la/s colonia/s presenta el mismo color. Esta especie desarrolla un micelio aéreo blanco con ligeras pigmentaciones granate y amarillo claro. Es algodonoso, denso y se desarrolla aleatoriamente cubriendo parcialmente la superficie del medio de cultivo.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL MICELIO

Las **hifas** son hialinas, tabicadas y ramificadas. Pueden alcanzar grosores máximos de hasta 5 μm . Excepcionalmente presentan algunos engrosamientos que alcanzan hasta 7,5 μm de anchura. (Figura 6.B).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

Son muy abundantes las **clamidosporas**, tanto hialinas como pigmentadas de un ligero color ocre (esto último puede deberse a que se traten de clamidosporas de doble pared) que muy posiblemente sea la causa del color del micelio de las colonias. Tienen diámetros en torno a 7,5 – 10 μm , aparecen tanto terminales (Figura 6.C) como intercalares (Figura 6.D) y en racimos.

Esta especie produce una gran cantidad de **macroconidios** fusiformes de entre 17,5 – 37,5 μm de longitud y 3,75 – 5 μm de anchura, hialinos y septados. Pueden tener entre 3 y 5 tabiques. (Figura 6.F). Pueden aparecer también mesoconidios fusiformes e hialinos de hasta 7,5 – 10 μm de longitud y 2,5 μm de anchura pero sin septar. En preparaciones para el microscopio es muy fácil de observar **fiálides** en las hifas (Figura 6.E).

Fusarium oxysporum

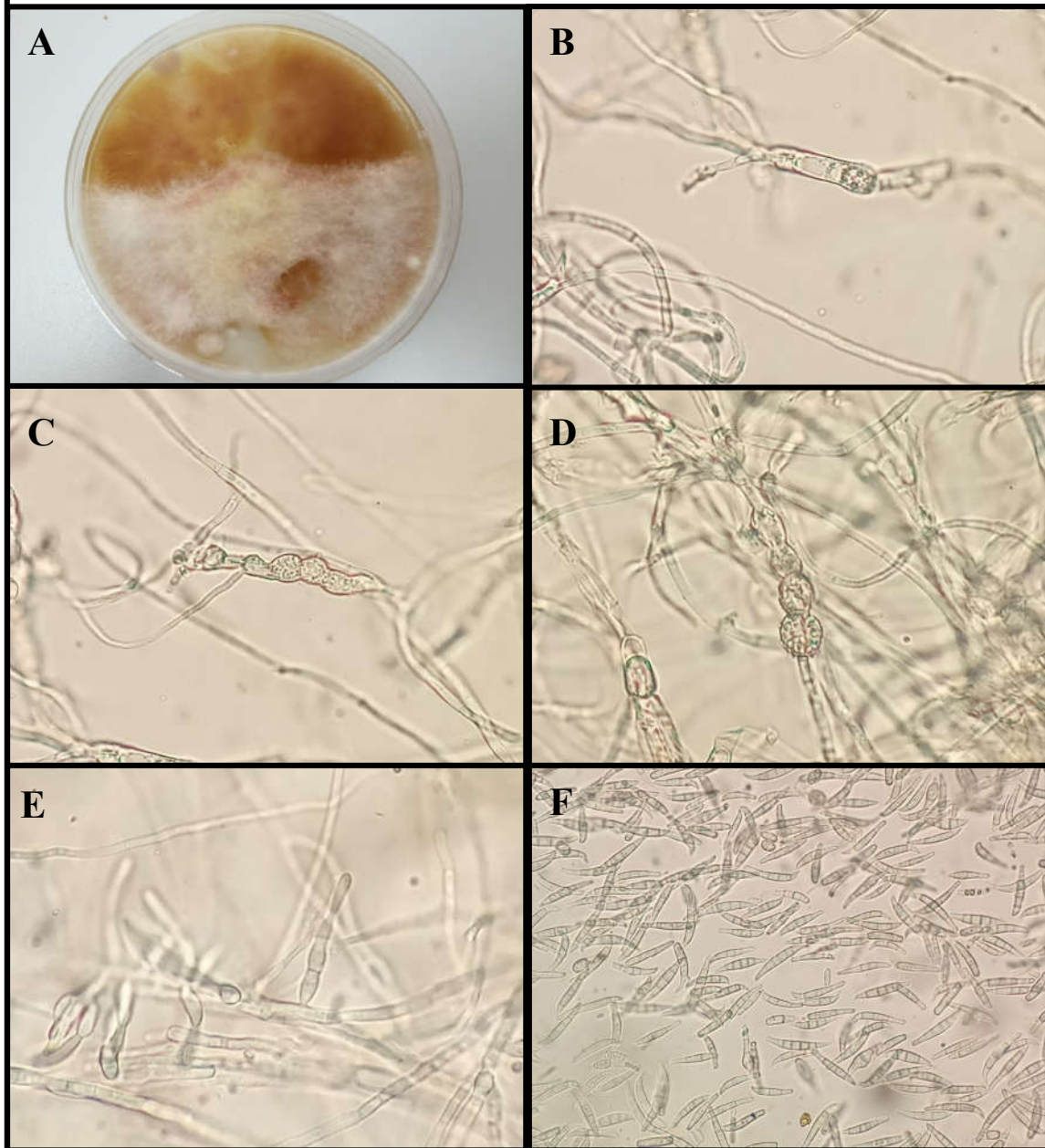


Figura 6 anexo. Cultivo de *Fusarium oxysporum* en medio agar PDA con estreptomicina (A). Detalles microscópicos de los engrosamientos de sus hifas (B), los racimos de clamidosporas terminales (C) e intercalares (D), unas fiálides (E) y sus macroconidios tabicados y madurados (F). (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Fuente: elaboración propia).

Fusarium proliferatum

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS EXTERNAS

El micelio que se desarrolla en el agar otorga al medio de cultivo un **color** morado oscuro en el anverso de la/s colonia/s (Figura 7.A). El reverso de la/s colonia/s presenta un tono más oscuro. Esta especie desarrolla un micelio aéreo blanco con ligeras pigmentaciones moradas y violetas. Es algodonoso y se desarrolla aleatoriamente formando pequeñas islas.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL MICELIO

Las **hifas** son hialinas, tabicadas y ramificadas. Pueden alcanzar grosores de entre 1,25 – 3,75 μm . (Figura 7.B).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

Esta especie no parece producir **clamidosporas**.

Escasa presencia de **macroconidios**. Estos son fusiformes, hialinos y sin tabicar por norma general con longitudes de hasta 32,5 μm y anchuras de 5 μm (Figura 7.C).

Abundante producción de **microconidios** hialinos, baciliformes, ovalados y rectangulares. Estos no presentan tabiques y llegan a medir hasta 17,5 μm de longitud y 2,5 μm de anchura. Algunos presentan forma fusiforme, aunque por tamaño perfectamente podrían ser macroconidios sin madurar (mesoconidios). (Figura 7.D).

Fusarium proliferatum

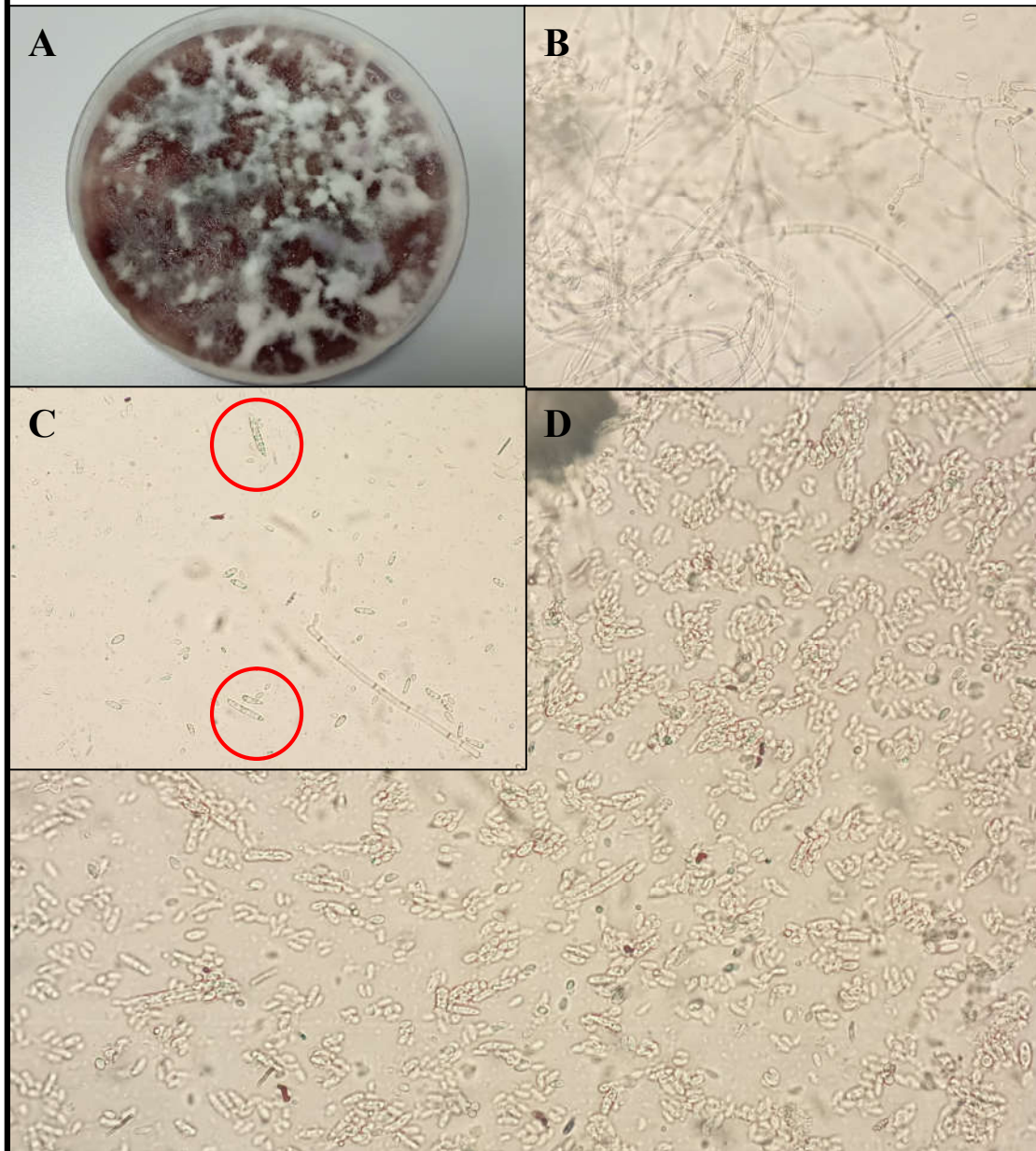


Figura 7 anexo. Cultivo de *Fusarium proliferatum* en medio agar PDA con estreptomycin (A). Detalles microscópicos de sus hifas (B), algunos de sus escasos macroconidios (C) y su abundante variedad de microconidios (D). (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Fuente: elaboración propia).

Fusarium solani

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS EXTERNAS

El micelio que se desarrolla en el agar otorga al medio de cultivo un **color** beige claro con una ligera pigmentación marrón en el anverso de la/s colonia/s (Figura 8.A). El reverso adquiere un tono aún más oscuro de ese mismo color. El micelio es pulverulento, casi inexistente. Es frecuente la formación de esporodoquios.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL MICELIO

Las **hifas** son hialinas, presentan tabiques y ramificaciones. Pueden alcanzar grosores máximos de hasta 5 μm . La presencia de hifas es mucho menos notoria en comparación con otras especies del género, siendo en algunos casos complicado encontrarlas en las preparaciones para el microscopio puesto que la abundante producción de conidios puede ocultarlas. (Figura 8.C).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

Esta especie no parece producir **clamidosporas**.

También produce una elevada cantidad de **macroconidios** fusiformes de entre 20 - 37,5 μm de longitud y 3,75 – 7,5 μm de anchura, hialinos y sin septar. Aparecen tímidamente macroconidios aún sin madurar (o mesoconidios), fusiformes incompletos u ovalados, sin septar, hialinos también y con tamaños que alcanzan como mucho 10 μm de longitud y 2,5 μm de anchura (Figuras 8.B y 8.D).

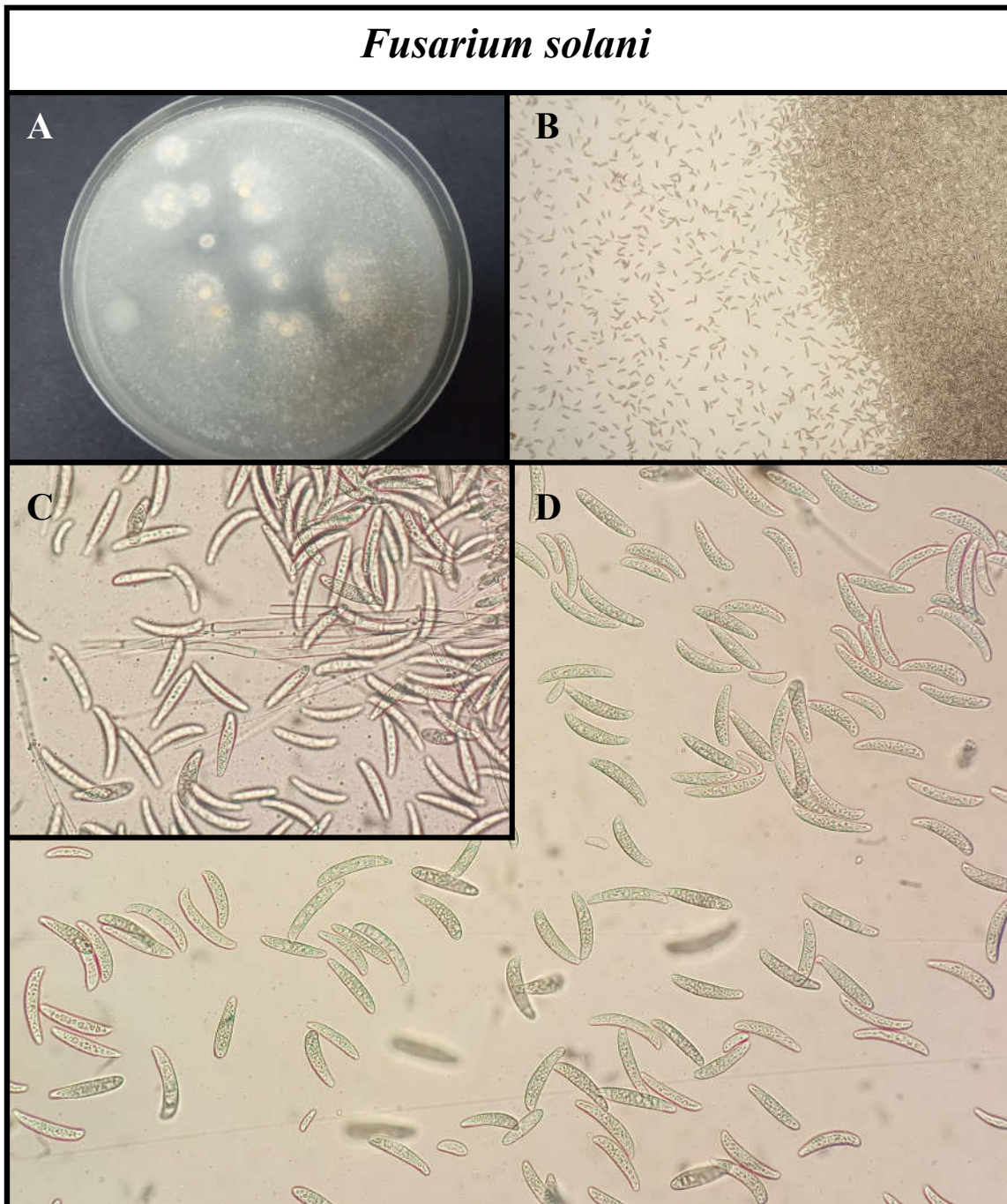


Figura 8 anexo. Cultivo de *Fusarium solani* en medio agar PDA con estreptomina (A). Detalles microscópicos de su abundante producción de macroconidios (B), sus escasas hifas (C) y sus macroconidios tanto maduros como inmaduros (D). (Fotografías obtenidas en los laboratorios del área de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Fuente: elaboración propia).

Acremonium sclerotigenum – *Sarocladium strictum*

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS EXTERNAS

El micelio que se desarrolla en el agar otorga al medio de cultivo un **color** rosa salmón claro con algunas manchas granate claro en el anverso de la/s colonia/s (Figura 9.A). En el reverso de la/s colonia/s se puede apreciar que algunos núcleos de colonias son de color granate oscuro y otros morados. Esta especie desarrolla un micelio aéreo blanco con ligeras pigmentaciones moradas y granate. Es algodonoso y se desarrolla aleatoriamente formando islas.

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL MICELIO

Las **hifas** son hialinas y ramificadas pero aparentemente no están tabicadas. Pueden alcanzar grosores de entre 2,5 – 8,25 μm . (Figura 9.B).

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

Esta especie no produce **clamidosporas**.

Los **conidios** de esta especie son una de sus características más diferenciadoras. Estos tienen una forma muy homogénea, son todos rectangulares con los extremos a veces ligeramente ovalados, hialinos y no están septados. Miden entre 5 y 12,5 μm de longitud y 1,25 – 3,75 μm de anchura y se forman acrópetamente, es decir, las hifas se segmentan y se rompen en fragmentos de igual tamaño (los propios conidios) que se liberan al medio. Es por esta razón por la que se pueden apreciar una cantidad ingente de conidios e igualmente se pueden apreciar cadenas de éstos o hifas en proceso de fragmentarse (Figura 9.C y 9.D).

Acremonium sclerotigenum – *Sarocladium strictum*

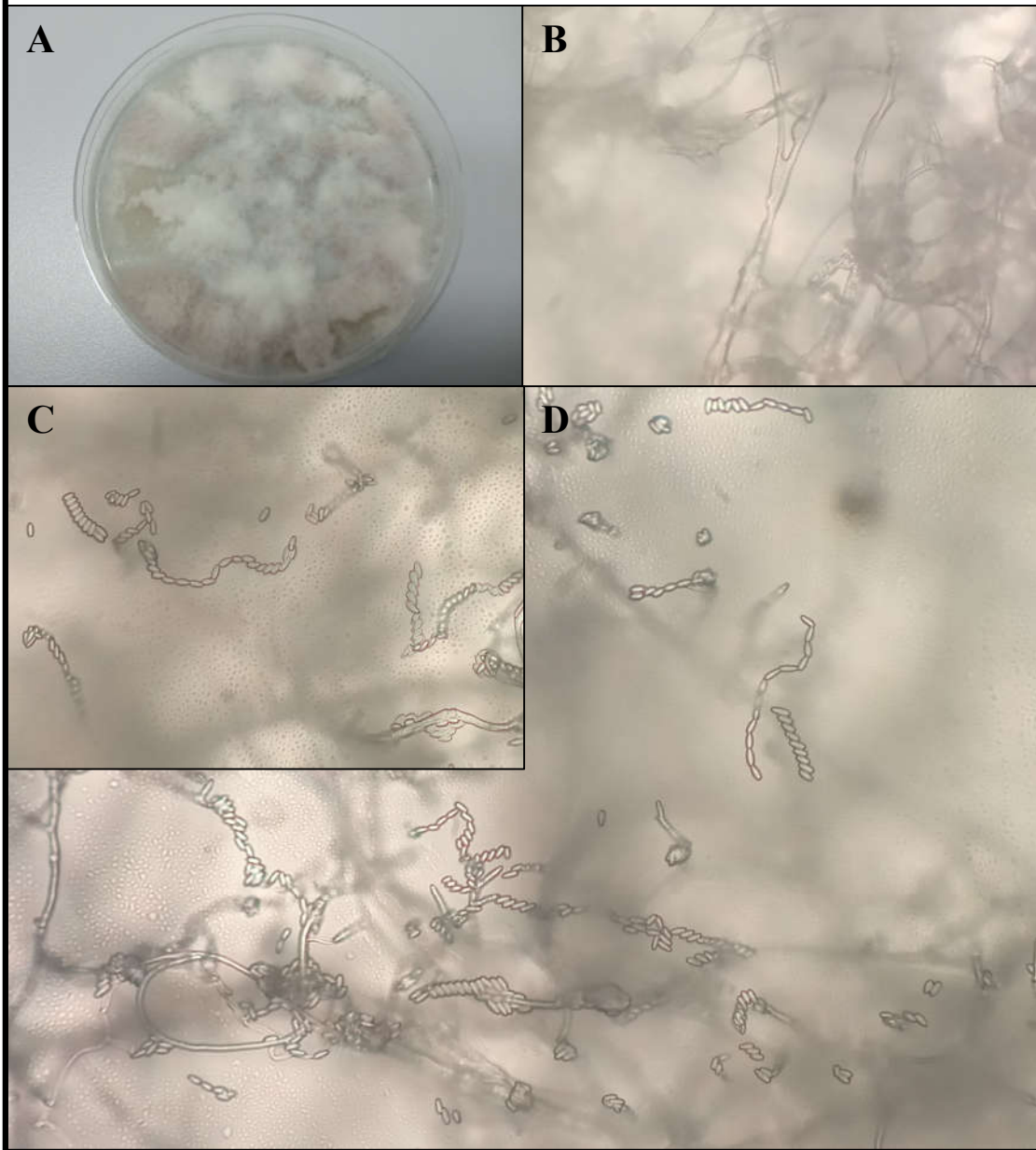


Figura 9 anexo. Cultivo de *Acremonium sclerotigenum* – *Sarocladium strictum* en medio agar PDA con estreptomicina (A). Detalles microscópicos de sus hifas (B), unas cadenas de conidios (C) y la formación de estos últimos acrópetamente (D). (Fotografías obtenidas en los laboratorios del departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Fuente: elaboración propia)

Anexo III: Estudio económico

Tratamiento 1

Año	C.O	C.E	P.O	P.E	R _i	R _{ja}	P. Retorno
0	0	0	0	50000	-50000	-50000,00	-50000,00
1	719650	0	640000	21800,22	57849,78	59585,27	9585,27
2	719650	0	640000	21800,22	57849,78	61372,83	70958,11
3	719650	0	640000	21800,22	57849,78	63214,02	134172,12
4	719650	0	640000	21800,22	57849,78	65110,44	199282,56
5	719650	0	640000	21800,22	57849,78	67063,75	266346,31
6	719650	0	640000	21800,22	57849,78	69075,66	335421,97
7	719650	0	640000	21800,22	57849,78	71147,93	406569,90
8	719650	0	640000	21800,22	57849,78	73282,37	479852,27
9	719650	0	640000	21800,22	57849,78	75480,84	555333,12
10	719650	0	640000	21800,22	57849,78	77745,27	633078,38
11	719650	0	640000	21800,22	57849,78	80077,62	713156,01
12	719650	0	640000	21800,22	57849,78	82479,95	795635,96
13	719650	0	640000	21800,22	57849,78	84954,35	880590,31
14	719650	0	640000	21800,22	57849,78	87502,98	968093,30
15	719650	0	640000	21800,22	57849,78	90128,07	1058221,37
16	719650	0	640000	21800,22	57849,78	92831,91	1151053,28
17	719650	0	640000	21800,22	57849,78	95616,87	1246670,16
18	719650	0	640000	21800,22	57849,78	98485,38	1345155,53
19	719650	0	640000	21800,22	57849,78	101439,94	1446595,47
20	719650	0	640000	21800,22	57849,78	104483,14	1551078,61

VAN	1.106.995,60 €
TIR	122%

C.O = Cantidad de producto vendido exitosamente al año por su precio de venta (972.500 kg * 0,74 €/kg)

P.O = Costes de producción de los 1.000.000 de kg de producto (1.000.000 kg * 0,64 €/kg)

P.E = Costes del equipo en el año 0 (50.000 €) y sus costes de mantenimiento anuales del año 0 a 20 (16.800 € de sueldo del operario, 5.000 € de mantenimiento anual y 0,22 € en consumo eléctrico de las lámparas)

La tasa de interés empleada para calcular el VAN y los flujos de caja actualizados (R_{ja}) es el precio del dinero, un 3%.

Tratamiento 2

Año	C.O	C.E	P.O	P.E	R_j	R_{ja}	P. Retorno
0	0	0	0	50000	-50000	-50000,00	-50000,00
1	721500	0	640000	21800,63	59699,37	61490,35	11490,35
2	721500	0	640000	21800,63	59699,37	63335,06	74825,41
3	721500	0	640000	21800,63	59699,37	65235,11	140060,53
4	721500	0	640000	21800,63	59699,37	67192,17	207252,69
5	721500	0	640000	21800,63	59699,37	69207,93	276460,62
6	721500	0	640000	21800,63	59699,37	71284,17	347744,79
7	721500	0	640000	21800,63	59699,37	73422,69	421167,49
8	721500	0	640000	21800,63	59699,37	75625,38	496792,87
9	721500	0	640000	21800,63	59699,37	77894,14	574687,00
10	721500	0	640000	21800,63	59699,37	80230,96	654917,96
11	721500	0	640000	21800,63	59699,37	82637,89	737555,85
12	721500	0	640000	21800,63	59699,37	85117,03	822672,88
13	721500	0	640000	21800,63	59699,37	87670,54	910343,42
14	721500	0	640000	21800,63	59699,37	90300,65	1000644,07
15	721500	0	640000	21800,63	59699,37	93009,67	1093653,74
16	721500	0	640000	21800,63	59699,37	95799,96	1189453,71
17	721500	0	640000	21800,63	59699,37	98673,96	1288127,67
18	721500	0	640000	21800,63	59699,37	101634,18	1389761,85
19	721500	0	640000	21800,63	59699,37	104683,21	1494445,06
20	721500	0	640000	21800,63	59699,37	107823,70	1602268,76

VAN	1.143.987,40 €
TIR	126%

C.O = Cantidad de producto vendido exitosamente al año por su precio de venta (975.000 kg * 0,74 €/kg)

P.O = Costes de producción de los 1.000.000 de kg de producto (1.000.000 kg * 0,64 €/kg)

P.E = Costes del equipo en el año 0 (50.000 €) y sus costes de mantenimiento anuales del año 0 a 20 (16.800 € de sueldo del operario, 5.000 € de mantenimiento anual y 0,63 € en consumo eléctrico de las lámparas)

La tasa de interés empleada para calcular el VAN y los flujos de caja actualizados (R_{ja}) es el precio del dinero, un 3%.

Tratamiento 3

Año	C.O	C.E	P.O	P.E	R_j	R_{ja}	P. Retorno
0	0	0	0	50000	-50000	-50000,00	-50000,00
1	728900	0	640000	21801,88	67098,12	69111,06	19111,06
2	728900	0	640000	21801,88	67098,12	71184,40	90295,46
3	728900	0	640000	21801,88	67098,12	73319,93	163615,39
4	728900	0	640000	21801,88	67098,12	75519,53	239134,91
5	728900	0	640000	21801,88	67098,12	77785,11	316920,02
6	728900	0	640000	21801,88	67098,12	80118,66	397038,69
7	728900	0	640000	21801,88	67098,12	82522,22	479560,91
8	728900	0	640000	21801,88	67098,12	84997,89	564558,80
9	728900	0	640000	21801,88	67098,12	87547,83	652106,63
10	728900	0	640000	21801,88	67098,12	90174,26	742280,89
11	728900	0	640000	21801,88	67098,12	92879,49	835160,38
12	728900	0	640000	21801,88	67098,12	95665,88	930826,26
13	728900	0	640000	21801,88	67098,12	98535,85	1029362,11
14	728900	0	640000	21801,88	67098,12	101491,93	1130854,04
15	728900	0	640000	21801,88	67098,12	104536,68	1235390,72
16	728900	0	640000	21801,88	67098,12	107672,79	1343063,51
17	728900	0	640000	21801,88	67098,12	110902,97	1453966,47
18	728900	0	640000	21801,88	67098,12	114230,06	1568196,53
19	728900	0	640000	21801,88	67098,12	117656,96	1685853,49
20	728900	0	640000	21801,88	67098,12	121186,67	1807040,16

VAN	1.291.962,40 €
TIR	141%

C.O = Cantidad de producto vendido exitosamente al año por su precio de venta (985.000 kg * 0,74 €/kg)

P.O = Costes de producción de los 1.000.000 de Kg de producto (1.000.000 kg * 0,64 €/kg)

P.E = Costes del equipo en el año 0 (50.000 €) y sus costes de mantenimiento anuales del año 0 a 20 (16.800 € de sueldo del operario, 5.000 € de mantenimiento anual y 1,88 € en consumo eléctrico de las lámparas)

La tasa de interés empleada para calcular el VAN y los flujos de caja actualizados (R_{ja}) es el precio del dinero, un 3%.

Tratamiento 4

Año	C.O	C.E	P.O	P.E	R_i	R_{ja}	P. Retorno
0	0	0	0	50000	-50000	-50000,00	-50000,00
1	736300	0	640000	21806,29	74493,71	76728,52	26728,52
2	736300	0	640000	21806,29	74493,71	79030,38	105758,90
3	736300	0	640000	21806,29	74493,71	81401,29	187160,19
4	736300	0	640000	21806,29	74493,71	83843,33	271003,51
5	736300	0	640000	21806,29	74493,71	86358,63	357362,14
6	736300	0	640000	21806,29	74493,71	88949,39	446311,53
7	736300	0	640000	21806,29	74493,71	91617,87	537929,39
8	736300	0	640000	21806,29	74493,71	94366,40	632295,80
9	736300	0	640000	21806,29	74493,71	97197,40	729493,19
10	736300	0	640000	21806,29	74493,71	100113,32	829606,51
11	736300	0	640000	21806,29	74493,71	103116,72	932723,22
12	736300	0	640000	21806,29	74493,71	106210,22	1038933,44
13	736300	0	640000	21806,29	74493,71	109396,52	1148329,97
14	736300	0	640000	21806,29	74493,71	112678,42	1261008,39
15	736300	0	640000	21806,29	74493,71	116058,77	1377067,16
16	736300	0	640000	21806,29	74493,71	119540,54	1496607,70
17	736300	0	640000	21806,29	74493,71	123126,75	1619734,45
18	736300	0	640000	21806,29	74493,71	126820,55	1746555,00
19	736300	0	640000	21806,29	74493,71	130625,17	1877180,17
20	736300	0	640000	21806,29	74493,71	134543,93	2011724,10

VAN	1.439.874,20 €
TIR	156%

C.O = Cantidad de producto vendido exitosamente al año por su precio de venta (995.000 kg * 0,74 €/kg)

P.O = Costes de producción de los 1.000.000 de kg de producto (1.000.000 kg * 0,64 €/kg)

P.E = Costes del equipo en el año 0 (50.000 €) y sus costes de mantenimiento anuales del año 0 a 20 (16.800 € de sueldo del operario, 5.000 € de mantenimiento anual y 6,29 € en consumo eléctrico de las lámparas)

La tasa de interés empleada para calcular el VAN y los flujos de caja actualizados (R_{ja}) es el precio del dinero, un 3%