



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena

ESCUELA  
INTERNACIONAL DE  
DOCTORADO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN TÉCNICAS AVANZADAS EN INVESTIGACIÓN DESARROLLO  
AGRARIO Y ALIMENTARIO

TESIS DOCTORAL

NUEVAS ASOCIACIONES HOSPEDERO-PATÓGENO EN CULTIVOS HORTÍCOLAS DEL  
SUDESTE ESPAÑOL

Presentada por María Ángeles Parra Sáez para optar al  
grado de Doctora  
por la Universidad Politécnica de Cartagena

Dirigida por:  
Dr. JUAN ANTONIO MARTÍNEZ LÓPEZ

Cartagena, 2022



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena



DOCTORAL PROGRAMME IN ADVANCED TECHNIQUES IN AGRICULTURAL AND FOOD  
RESEARCH AND DEVELOPMENT

PhD THESIS

NEW HOST-PATHOGEN ASSOCIATIONS OF HORTICULTURAL CROPS IN THE  
SOUTH-EAST OF SPAIN

Presented by MARÍA ÁNGELES PARRA SÁEZ  
to the Technical University of Cartagena in fulfilment of  
the thesis requirement for the award of PhD

Supervisor:  
Dr. JUAN ANTONIO MARTÍNEZ LÓPEZ

Universidad Politécnica de Cartagena



---

**NUEVAS ASOCIACIONES  
HOSPEDERO-PATÓGENO EN  
CULTIVOS HORTÍCOLAS DEL  
SUDESTE ESPAÑOL**

---

Tesis doctoral

**María Ángeles Parra Sáez**

Director

**Juan Antonio Martínez López**

2022

No dejes apagar el entusiasmo,  
virtud tan valiosa como necesaria;  
trabaja, aspira, tiende siempre  
hacia la altura.

-Rubén Darío-

*A mi familia*

## AGRADECIMIENTOS

---

Era una mañana de marzo de 2019 en la que durante mi habitual trayecto de Mazarrón a Cartagena escuchaba la radio, mi compañera de viaje durante estos años. Entonces oí las palabras de una psicóloga sobre la importancia de practicar la gratitud. Hablaba del ejercicio mental de agradecimiento que la afroamericana Oprah Winfrey realizaba diariamente, hecho que le había permitido encaminar su vida de una mejor manera. Ello había sido clave para su realización personal, además de conseguir así el éxito y la felicidad. Supe, que en algún momento, rescataría esas palabras para comenzar las primeras líneas de este apartado. Hoy me toca reconocer en varios párrafos toda la atención que he recibido de aquellas personas que me han impulsado a llegar a este punto, y que han despertado en mí el sentimiento de gratitud.

Comenzaré por mi director, el motor fundamental de esta tesis, la persona que confió en mí para el desarrollo de una idea de negocio a la que se le ha tratado de dar forma desde 2013. A pesar de las muchas dificultades vividas, no hemos perdido las ganas de ofrecer la ciencia al servicio de las empresas del sector hortofrutícola. Espero seguir siendo para ti “la mejor cultivadora del reino Fungi”. Son muchos los valores que me has transmitido: disciplina, perseverancia, orden, sacrificio, responsabilidad, paciencia, capacidad de trabajo y sobre todo humildad. Que las injusticias nunca modifiquen la ilusión inicial que nos mueve.

Por supuesto, esta tesis no habría sido posible sin el apoyo financiero de las empresas con las que hemos colaborado durante todos estos años. Destaco los proyectos y prestaciones de servicios llevadas a cabo con BIOTEK Agriculture España S.L., SAKATA SEED IBÉRICA S.L.U., POZO SUR S.L. y el GRUPO CFM S.A.T. 9821 (FRUCA Marketing). Ha sido muy gratificante conocer y dar solución a problemas reales que limitan la actividad de la industria agraria y alimentaria.

Llegado este punto, y en relación con mi formación, quiero acordarme de Dina, por ser la responsable primera de mi gusto por la fitopatología. Nada fue lo mismo después de conocer la tuberculosis del olivo, el cribado del melocotonero o el chancro del almendro. Motivaste mi inquietud hacia el conocimiento de las enfermedades de las plantas de una forma especial. Tu servicio para la realización de los análisis genéticos de los aislados ha sido fundamental para el desarrollo de los ensayos.

Sobre manipulación de microorganismos y estudios moleculares asociados, también ha sido importante la estrecha relación que hemos mantenido con el grupo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de Valencia. El ofrecernos registrar nuestra colección de microorganismos en REDESMI, fue uno de los procesos más gratificantes que he vivido durante esta etapa. En vuestras manos, no me cabe duda de que los recursos microbianos españoles están a buen recaudo. Destaco el buen hacer de Laura, experta en eucariotas; ha sido un placer trabajar contigo.

Para mi aprendizaje, fue crucial la aceptación de estancia por parte de Florent Truouillas en el laboratorio de patología de frutales de la UC Davis, al que agradezco la oportunidad que me brindó de compartir durante varios meses inquietudes y conocimientos con un equipo, el del Kearney, que no me pudo acoger mejor: Mo, Leslie, Cassie, Ramón y Tere, conseguisteis que jamás pueda olvidar el verano de 2018.

Es el turno de mis cinco mujeres especiales: María, Eli, Isa, Lucía y Empe. Siempre me habéis dado el impulso que necesitaba, ya sea siguiéndome en las exposiciones del doctorado, elogiando mis logros o animándome a cerrar esta etapa. Entre esas mujeres especiales falta Desi, no me equivoco al decir que era mi otra mitad. La vida nos separó muy pronto, pero estoy segura de que te habría gustado verme en la defensa. Te sentiré conmigo como lo estás cada día.

No me puedo olvidar de mi grupo de la ETSIA. Sois muchas las personas que me habéis acompañado durante este periodo. Hemos compartido un sinfín de vivencias que me han reportado mucha alegría, perdonadme si me dejo a alguien sin nombrar: Almudena, Inma, Ana, Virginia, Raquel, Javier, Cristina, Amador, Enrique, Elena, etc., sin vosotros/as nada habría sido lo mismo.

Me gustaría finalizar haciendo una mención especial a mi familia; ellos han experimentado en parte el sufrimiento de esta tesis. Quiero expresar mi agradecimiento especialmente a Antonio y Luci que han tenido en este sentido una admirable paciencia. Agradezco la educación recibida por mis padres y abuelos; ellos forjaron de alguna manera el carácter y la personalidad de la mujer que soy hoy; les debo mucho. Por supuesto, guardaré en la memoria de mi corazón todo el apoyo, ánimo y comprensión que me habéis dado, no solo durante este proceso, sino a lo largo de toda mi formación educativa. Que a partir de ahora no existan limitaciones y os pueda dedicar el tiempo que merecéis.

Por último, a ti, que me lees ahora, te agradezco el interés por mi trabajo.

*M. Angeles*





## RESUMEN

---

Ante la elevada pérdida de productos hortofrutícolas como consecuencia de las enfermedades, se hace necesario seleccionar una adecuada estrategia de gestión y control de las mismas. Los cambios climáticos actuales pueden modificar la supervivencia y el desarrollo de los patógenos vegetales, así como sus fuentes y formas de transmisión, hecho que ha afectado a la distribución geográfica de las especies. Para las nuevas interacciones que tengan lugar en estas áreas, será crucial el diagnóstico correcto de los agentes causales. Bajo este contexto, en esta tesis doctoral se han estudiado nuevas patologías del brócoli, el melón y la calabaza.

En el brócoli, se aisló al oomiceto *Pythium ultimum* Trow, (1901), sin. *Globisporangium ultimum* (Trow) Uzuhashi, Tojo y Kakish, creciendo junto a varias especies de bacterias, en el interior de tallos florales de brócoli maduro, lo que provocó una descomposición acuosa de los tejidos de síntomas muy similares a los producidos por la podredumbre blanda bacteriana. La podredumbre interna del tallo del brócoli a la que hacemos referencia, ha sido descrita habitualmente como una enfermedad denominada podredumbre blanda bacteriana causada por bacterias pectolíticas. De hecho, la bacteria *Pectobacterium carotovorum* Jones, (1901) se asocia a menudo con la podredumbre interna de esta hortaliza. Sin embargo, en este trabajo se aisló a *P. ultimum*, causando una podredumbre blanda interna de los tejidos cuyos síntomas eran similares a los de la podredumbre blanda bacteriana. No obstante, *P. ultimum* se describe principalmente como un patógeno que causa “damping-off” y podredumbre de la raíz en muchas plantas de vivero, incluyendo el brócoli. Los síntomas de la enfermedad ocasionados por este pseudohongo se reprodujeron en secciones de tallo de brócoli para verificar los postulados de Koch. Las bacterias aisladas en el frente de avance de la podredumbre no causaron la enfermedad, pero cuando crecían *in vitro* con *P. ultimum*, sí que interferían en su desarrollo. Se estudiaron los rasgos fenotípicos y genotípicos de los agentes implicados en la patología con el objetivo de aumentar el

conocimiento de las características básicas de esta enfermedad inusual y del organismo causal responsable.

En frutos de melón, se ha identificado una alta incidencia de patógenos en dos variedades comerciales de este vegetal: galia (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) y cantalupo (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*). Los frutos presentaron desarrollo de micelio blanquecino y ablandamiento de la pulpa. Los análisis morfológico y molecular permitieron identificar a los agentes causales responsables de las lesiones que fueron, para la variedad galia: *Fusarium solani* y *Fusarium brachyggibosum* y para cantalupo: *Fusarium equiseti* y *Fusarium annulatum*. El análisis molecular distinguió a estas especies en cuatro linajes diferentes dentro del género *Fusarium*, siendo estos complejos los de *Fusarium solani* (FSSC), *Fusarium sambucinum* (FSAMSC), *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) y *Fusarium fujikuroi* (FFSC), respectivamente. La patogenicidad de los aislados fue probada en melones sanos para verificar los postulados de Koch. Los primeros síntomas de podredumbre se observaron 3 días después de las inoculaciones a 28 °C. La infección en los frutos sanos solo tuvo lugar en melones heridos artificialmente. Los síntomas fueron similares a los observados en los especímenes suministrados inicialmente y se volvieron a aislar los 4 patógenos de las heridas. Hay que destacar que estas patologías aparecen durante la fase poscosecha, pudiendo generar importantes pérdidas económicas especialmente en aquellas partidas cuyo destino es el mercado exterior.

En calabaza butternut se identificó al zigomiceto *Rhizopus sexualis* var. *sexualis*, provocando una podredumbre caracterizada por el ablandamiento y descomposición de sus tejidos. Este tipo de patología ha sido frecuentemente asociada a *Rhizopus stolonifer*, siendo uno de los patógenos más comunes del género *Rhizopus*. Sin embargo, el estudio morfológico del aislado señaló la presencia de una ramificación superior umbeliforme de los esporangióforos no descrita en *R. stolonifer*. Además, el análisis molecular denotó la presencia de múltiples secuencias ITS, como consecuencia de una heterocariosis casual de la especie *R. sexualis* var. *sexualis*. La secuencia de la región D1/D2 del gen ARNr 28S fue similar a *R. stolonifer*. El crecimiento *in vitro* de *R. sexualis* var. *sexualis* indicó que, a 25 °C, se producía una mayor velocidad de desarrollo y formación de esporangios, mientras que a temperaturas inferiores no se completaba el

desarrollo en medio de cultivo sintético ni se alcanzaba la esporulación. La inoculación del patógeno a calabazas sanas desveló la necesidad de la existencia de una herida para que se reprodujera la enfermedad. Finalmente, el patógeno volvió a ser aislado del punto de inoculación e identificado hasta completar los postulados de Koch.

En conclusión, se ha buscado ejercer una gran precisión identificativa de los patógenos que causan enfermedades en los productos hortofrutícolas. La mayoría de estas identificaciones están siendo incompletas porque se llega solamente a nivel de género y también mal categorizadas a nivel práctico, por lo que este trabajo resulta crucial si se quiere garantizar el éxito de los futuros tratamientos fitosanitarios que se apliquen.



## ABSTRACT

---

The high loss of fruit and vegetable products due to disease makes it necessary to follow an adequate strategy for their management and control. Current climatic changes may modify the survival and development of plant pathogens, as well as their sources and transmission mechanisms, all of which has affected the geographical distribution of species. For new interactions in these areas, a correct diagnosis of the causal agents is crucial. This doctoral thesis presents a study of new pathologies of broccoli, melon and pumpkin in the current context.

In the case of broccoli, the oomycete fungus-like *Pythium ultimum* Trow, (1901), syn. *Globisporangium ultimum* (Trow) Uzuhashi, Tojo and Kakish, growing together with several bacterial species, was isolated inside of mature broccoli flower stalks. This caused aqueous decay of tissues with symptoms very similar to those produced by bacterial soft rot. The internal stem rot of broccoli has been described as a disease called bacterial soft rot caused by pectolytic bacteria. In fact, the bacterium *Pectobacterium carotovorum* Jones, (1901) is often associated with internal rot of this vegetable. However, in this study, *P. ultimum* was isolated causing internal soft rot of tissues, whose symptoms were similar to those of bacterial soft rot. Nevertheless, *P. ultimum* is mainly described as a pathogen causing damping-off and root rot on many nursery plants, including broccoli. Disease symptoms caused by this pseudofungus were reproduced in broccoli stem sections to verify Koch's postulates. Bacteria isolated near the affected tissue did not cause the disease, but when *in vitro* grown with *P. ultimum*, they did interfere with its development. Phenotypic and genotypic traits of the organisms involved in the pathology were studied with the aim of increasing knowledge of the basic characteristics of this unusual disease and the causal organism involved in it.

As regards melon, a high incidence of pathogens was identified on two commercial varieties: galia (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) and cantaloupe (*Cucumis melo* var.

*cantalupensis*). Fruits showed development of whitish mycelium and softening pulp. Morphological and molecular analysis were carried out to identify the causal organisms of diseases, which were *Fusarium solani* and *Fusarium brachyggibosum* for galia and *Fusarium equiseti* and *Fusarium annulatum* for cantaloupe. The molecular analysis distinguished these species into four different lineages within the genus *Fusarium*, being *Fusarium solani* (FSSC), *Fusarium sambucinum* (FSAMSC), *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) and *Fusarium fujikuroi* (FFSC), respectively. The pathogenicity of isolates was tested on healthy fruit melons to verify Koch's postulates. The first rot symptoms were observed 3 days after inoculations at 28 °C. Infection of healthy fruits only occurred in artificially wounded melons. Symptoms were similar to those observed in the initially supplied specimens, and all four pathogens were re-isolated from wounds. It should be noted that these pathologies appearing during the postharvest period may cause significant economic losses, especially in products whose destination is the foreign market.

Regarding butternut squash, the fungus *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* was identified in as a cause for rot characterized by the softening and decomposition of tissues. The symptoms observed have been frequently associated with *Rhizopus stolonifer*, the most common pathogen of the genus *Rhizopus*, but a morphological study of the isolate pointed out some umbeliform upper branching of sporangia not described in *R. stolonifer*. In addition, the molecular analysis identified multiple ITS sequences caused by a casual heterokaryosis of the species *R. sexualis* var. *sexualis*. The sequence of the D1/D2 region of the 28S rRNA gene was found to be similar to that of *R. stolonifer*. The *in vitro* growth of *R. sexualis* var. *sexualis* indicated that, at 25 °C, there was a higher rate of development and sporangia, while at lower temperatures development was not completed in synthetic culture medium and sporulation was not reached. Inoculation of the pathogen into healthy pumpkins revealed that a wound was necessary for disease development. Finally, the pathogen was re-isolated from affected tissues and identified in order to establish Koch's postulates.

In conclusion, the aim of this doctoral thesis was to achieve a high level of precision in the identification of pathogens that cause diseases in fruit and vegetables. Most of these identifications are currently being either incomplete because of their only scope at

genus level, or poorly categorised on a practical level, which makes this work crucial if we want to guarantee the success of future phytosanitary treatments.





# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IX</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Introducción general.....</b>	<b>1</b>
1.1. Importancia de los cultivos hortícolas en el sudeste español.....	1
1.1.1. Superficies y producciones de cultivos hortícolas.....	1
1.2. Almacenamiento de frutas y hortalizas.....	3
1.2.1. Conservación refrigerada.....	3
1.2.2. Atmósferas modificadas (AM) y controladas (AC).....	4
1.2.3. Tratamientos térmicos.....	5
1.2.4. Radiación ultravioleta-C.....	6
1.2.5. Tratamiento hipobárico e hiperbárico.....	7
1.3. Enfermedades de frutas y hortalizas durante la postrecolección.....	8
1.3.1. Factores que influyen en el desarrollo de la infección.....	8
1.3.2. Patógenos que causan enfermedades poscosecha.....	10
1.3.3. Modo de infección.....	11
1.4. Problemática del diagnóstico en poscosecha y gestión de tratamientos de control.....	13
1.4.1. Tratamientos químicos poscosecha.....	14
1.4.1.1. Métodos de higienización y desinfección.....	15
1.4.2. Control biológico.....	16
1.4.2.1. Microorganismos antagonistas.....	17
1.4.3. Compuestos naturales.....	18
1.4.3.1. Aceites esenciales.....	18
1.4.3.2. Extractos de plantas.....	19

1.4.4. Revestimientos y películas comestibles.....	20
1.4.5. Aditivos alimentarios: sales orgánicas e inorgánicas.....	21
1.4.6. Inducción de resistencia en el huésped.....	21
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>CHAPTER 2</b>	
<b>Objectives.....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Materiales y métodos generales.....</b>	<b>27</b>
3.1. Descripción de la sintomatología.....	27
3.2. Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica.....	29
3.2.1. Caracterización de bacterias.....	29
3.2.2. Caracterización de hongos filamentosos.....	31
3.3. Caracterización genética molecular.....	33
3.3.1. Identificación de bacterias.....	34
3.2.2. Identificación de hongos filamentosos.....	35
3.3.2.1. Región ITS1 - 5,8S - ITS2.....	35
3.3.2.2. Región D1/D2 del gen 28S y gen TEF- $\alpha$ (“transcription elongation factor”).....	36
3.4. Caracterización filogenética.....	38
3.5. Métodos de conservación de microorganismos.....	39
3.5.1. Conservación por resiembra periódica.....	40
3.5.2. Conservación en agua destilada estéril.....	41
3.5.3. Conservación por congelación.....	42
3.5.3.1. Uso de un agente crioprotector.....	42
3.5.3.2. Velocidad de enfriamiento y de descongelación.....	43
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>La necrosis del escapo floral de brócoli causada por <i>Pythium ultimum</i>.....</b>	<b>45</b>
4.1. Introducción.....	45
4.2. Materiales y métodos.....	47
4.2.1. Aislamientos de los microorganismos.....	47

4.2.2. Identificación fenotípica de los microorganismos.....	48
4.2.3. Identificación molecular de los microorganismos.....	49
4.2.4. Confrontación <i>in vitro</i> de los microorganismos implicados.....	50
4.2.5. Desarrollo de poblaciones mixtas de los microorganismos implicados creciendo <i>in vitro</i> .....	51
4.2.6. Inoculación de los microorganismos a piezas de tejidos vegetales sanos.....	52
4.3. Resultados.....	54
4.3.1. Etiología y descripción de la sintomatología.....	54
4.3.2. Caracterización fenotípica de los microorganismos.....	55
4.3.3. Caracterización molecular de los microorganismos.....	59
4.3.4. Crecimiento <i>in vitro</i> de los microorganismos enfrentados.....	61
4.3.5. Crecimiento combinado de los microorganismos <i>in vitro</i> .....	65
4.3.6. Patogenicidad en escapos de brócoli sanos.....	69
4.4. Discusión.....	71
4.5. Conclusiones.....	79
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de <i>Fusarium</i>.....</b>	<b>81</b>
5.1. Introducción.....	81
5.2. Materiales y métodos.....	84
5.2.1. Muestreo y aislamiento de patógenos.....	84
5.2.2. Observación y caracterización morfológica.....	86
5.2.3. Identificación molecular.....	86
5.2.4. Ensayos de patogenicidad y evaluación de la severidad de las enfermedades.....	86
5.3. Resultados.....	88
5.3.1. Estudio molecular.....	88
5.3.2. Características morfológicas de los aislados.....	89
5.3.3. Patogenicidad.....	96
5.4. Discusión.....	99
5.5. Conclusiones.....	105

<b>CAPÍTULO 6</b>	
<b>Podredumbre por Rhizopus en la calabaza.....</b>	<b>107</b>
6.1. Introducción.....	107
6.2. Materiales y métodos.....	110
6.2.1. Aislamiento fúngico.....	110
6.2.2. Caracterización morfológica.....	111
6.2.3. Análisis de la temperatura sobre el desarrollo fúngico.....	112
6.2.4. Identificación molecular y análisis filogenético.....	112
6.2.5. Determinación de la patogenicidad.....	113
6.3. Resultados.....	114
6.3.1. Estudio molecular y análisis filogenético.....	114
6.3.2. Características morfológicas.....	116
6.3.3. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo micelial.....	118
6.3.4. Test de patogenicidad.....	119
6.4. Discusión.....	120
6.5. Conclusiones.....	124
<b>CAPÍTULO 7</b>	
<b>Conclusiones generales.....</b>	<b>125</b>
<b>CHAPTER 7</b>	
<b>General conclusions.....</b>	<b>127</b>
<b>CAPÍTULO 8</b>	
<b>Producción científica resultante del período de realización de esta tesis doctoral.....</b>	<b>129</b>
<b>CAPÍTULO 9</b>	
<b>Bibliografía.....</b>	<b>131</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>1:1</b>	Efecto de la radiación UV-C sobre el desarrollo de <i>Cladosporium cladosporioides</i> inoculado a zonas del escriturado de melón galia demarcadas en círculos con rotulador. (a) fruto irradiado y (b) testigo.....	7
<b>1:2</b>	Daños mecánicos en calabaza butternut como consecuencia del sobrellenado del embalaje de almacenamiento. (a) herida fresca y (b) herida cicatrizada.....	9
<b>1:3</b>	Podredumbre mixta causada por diferentes especies fúngicas. (a) melón y (b) calabaza.....	11
<b>1:4</b>	Ensayos de eficacia de microorganismos con actividad antagonista contra patógenos fúngicos poscosecha de calabaza butternut. (a) antagonista <i>Bacillus licheniformis</i> contra <i>Alternaria</i> sp., (b) antagonista <i>Bacillus licheniformis</i> contra <i>Botrytis cinerea</i> , (c) antagonista <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> contra <i>Fusarium</i> sp.....	18
<b>3:1</b>	Material utilizado en la colección de microorganismos MAPYS para la conservación de bacterias y hongos filamentosos por congelación. (a) caja de almacenaje de crioviales, (b) contenedor Corning Coolcell y (c) crioviales estériles T311-3 (Simport).....	44
<b>4:1</b>	Grados de incidencia de los síntomas observados de la enfermedad en las piezas del tallo de brócoli. (a) asintomático (0), (b) síntoma atípico por coloración anormal (1), (c) síntoma típico por hipertrofia (2), (d) síntoma típico leve (3) y (e) síntoma típico medio (4).....	54
<b>4:2</b>	Síntomas internos de la podredumbre del tallo de brócoli. (a) apariencia inicial (médula blandeada y anillo pardeado), (b) anillo irregular de color ocre oscuro, observado en ocasiones en fases no muy avanzadas de la podredumbre, (c) síntoma avanzado, médula	

	completamente descompuesta, pardeamiento y anillo oscurecido bajo la corteza del tallo floral y (d) pieza del escapo floral que presentaba maceración de la médula desde el cuello hasta la zona de corte. Además, se puede apreciar un pardeamiento exterior en la sección intermedia.....	55
<b>4:3</b>	Aislado BRSA-02 de <i>Pythium ultimum</i> . (a) aspecto del micelio de BRSA-02 cultivado en PDA después de ser aislado de tallos de brócoli afectados por la podredumbre blanda y (b) detalle de las hifas del oomiceto existente en el tejido afectado. Barra de escala: b = 20 µm.....	56
<b>4:4</b>	Aislado BRSA-02 de <i>Pythium ultimum</i> en diferentes medios de cultivo a distintas temperaturas de incubación (10, 20 y 30 °C). (a) aspecto de BRSA-02 cultivado en agar de patata y dextrosa y (b) agar de jugo clarificado de V-8 al 10%.....	56
<b>4:5</b>	Estructuras reproductivas obtenidas de <i>Pythium ultimum</i> BRSA-02 cultivado en agar jugo clarificado de V-8 al 10%. (a) hinchamientos hifales intercalares, (b) oospora aplerótica madura, (c) oospora joven y (d) anteridio monoclinio unido a un oogonio joven. Barra de escala: a = 20 µm; b, c y d = 10 µm.....	57
<b>4:6</b>	Árbol filogenético basado en las secuencias ITS parciales de <i>Pythium ultimum</i> BRSA-02 y sus especies relacionadas disponibles en el GenBank utilizando el método de unión de vecinos con una prueba de arranque de 2.000 réplicas. La cepa MG734215 de <i>Fusarium solani</i> se utilizó como grupo externo.....	60
<b>4:7</b>	Desarrollo del micelio de <i>Pythium ultimum</i> BRSA-02 creciendo en PDA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c) y (d) presencia de bacterias aisladas. Desviación estándar (n = 4).....	62
<b>4:8</b>	Desarrollo del micelio de <i>Pythium ultimum</i> BRSA-02 creciendo en PCA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c) y (d) presencia de bacterias aisladas. Desviación estándar (n = 4).....	63
<b>4:9</b>	Cultivos combinados de <i>Pythium ultimum</i> BRSA-02 junto a <i>Ochrobactrum</i> sp. (aislado G) y <i>Pseudomonas putida</i> (aislado F)	

	creciendo en PDA a 26 °C tras 4 días. (a) <i>P. ultimum</i> BRSA-02, (b) <i>P. ultimum</i> BRSA-02 – <i>Ochrobactrum</i> sp. (G), (c) <i>P. ultimum</i> BRSA-02 – <i>P. putida</i> (F) y (d) <i>P. ultimum</i> BRSA-02 – [ <i>Ochrobactrum</i> sp. (G) + <i>P. putida</i> (F)].....	63
<b>4:10</b>	Daños ocasionados a las hifas sumergidas de <i>P. ultimum</i> BRSA-02 debido a la presencia de la bacteria <i>Ochrobactrum</i> sp. (aislado G). (a) <i>P. ultimum</i> BRSA-02 y (b) <i>P. ultimum</i> BRSA-02 junto a <i>Ochrobactrum</i> sp. (G). Barra de escala: a y b = 20 µm.....	63
<b>4:11</b>	Tasa de crecimiento del micelio de <i>Pythium ultimum</i> BRSA-02 creciendo en PDA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c) y (d) presencia de bacterias aisladas. Desviación estándar (n = 4).....	64
<b>4:12</b>	Tasa de crecimiento del micelio de <i>Pythium ultimum</i> BRSA-02 creciendo en PCA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c) y (d) presencia de bacterias aisladas. Desviación estándar (n = 4).....	65
<b>4:13</b>	Desarrollo del micelio de <i>Pythium ultimum</i> BRSA-02 creciendo en PDA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c), (d), (e), (f) y (g) presencia de bacterias aisladas, creciendo en el mismo punto junto al hongo. Desviación estándar (n = 4).....	66
<b>4:14</b>	Tasa de crecimiento del micelio de <i>Pythium ultimum</i> BRSA-02 creciendo en PDA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c), (d), (e), (f) y (g) presencia de bacterias aisladas, creciendo en el mismo punto junto al hongo. Desviación estándar (n = 4).....	68
<b>4:15</b>	Resultados de la inoculación de los microorganismos aislados a piezas de tallos de brócoli sanos, tras 10 días a 18 °C y 94% HR. (a) fragmento inoculado con <i>P. ultimum</i> BRSA-02, (b) <i>Ochrobactrum</i> sp., (c) <i>P. putida</i> , (d) <i>P. ultimum</i> BRSA-02 + <i>Ochrobactrum</i> sp., (e) <i>P. ultimum</i> BRSA-02 + <i>P. putida</i> y (f) <i>P. ultimum</i> BRSA-02 + <i>Ochrobactrum</i> sp. + <i>P. putida</i> .....	70
<b>5:1</b>	Sintomatología en frutos de galia y cantalupo causada por distintas especies de <i>Fusarium</i> . Podredumbre externa-interna: (a-e, b-f) galia y (c-g, d-h) cantalupo.....	85



<b>5:2</b>	Características morfológicas de <i>Fusarium solani</i> MLFR-01. (a-b) vista superior e inferior de la colonia en PDA tras 10 días a 26 °C, (c) macroconidios, (d-e) microconidios y (f) clamidospora terminal individual. Barra de escala: c = 20 µm; d, e = 10 µm y f = 5 µm.....	89
<b>5:3</b>	Características morfológicas de <i>Fusarium brachygibbosum</i> MLFR-03. (a-b) vista superior e inferior de la colonia en PDA tras 10 días a 26 °C, (c) microconidios, (d) macroconidios, (e) clamidospora unicelular terminal, (f) clamidospora intercalar en cadena corta, (g) monofiálides alargadas y (h) polifiálides cortas. Barra de escala: c, d, e, f, g y h = 10 µm.....	91
<b>5:4</b>	Características morfológicas de <i>Fusarium equiseti</i> MLFR-07. (a-b) vista superior e inferior de la colonia en PDA tras 10 días a 26 °C, (c) monofiálide corta, (d) macroconidios, (e) clamidospora individual y (f) clamidospora intercalar en cadena. Barra de escala: c = 5 µm, d = 20 µm, e y f = 10 µm.....	93
<b>5:5</b>	Características morfológicas de <i>Fusarium annulatum</i> MLFR-09. (a-b) vista superior e inferior de la colonia en PDA tras 10 días a 26 °C, (c) cadenas de microconidios, (d) polifiálides, (e) monofiálide, (f) microconidios y (g) macroconidios. Barra de escala: c = 20 µm; d, e, f y g = 10 µm.....	95
<b>5:6</b>	Cambios morfológicos tras las pruebas de patogenicidad con <i>Fusarium solani</i> MLFR-01 y <i>Fusarium brachygibbosum</i> MLFR-03 en melón galia ( <i>Cucumis melo</i> var. <i>reticulatus</i> ), <i>Fusarium equiseti</i> MLFR-07 y <i>Fusarium annulatum</i> MLFR-09 en cantalupo ( <i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i> ) 7 días después de la inoculación. (a-d) fruto control galia herido e inoculado con agua destilada estéril, (g-j) fruto control cantalupo herido e inoculado con agua destilada estéril, (b-e) fruto inoculado con <i>F. solani</i> MLFR-01, (c-f) fruto inoculado con <i>F. brachygibbosum</i> MLFR-03, (h-k) fruto inoculado con <i>F. equiseti</i> MLFR-07 y (i-l) fruto inoculado con <i>Fusarium annulatum</i> MLFR-09.....	97

<b>6:1</b>	<i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>sexualis</i> (CLBPZ-13) en frutos de calabaza butternut. (a) síntomas de pudrición blanda en la fruta almacenada previa distribución al mercado (b) daños mecánicos, depresión y micelio superficial y (c) bandas de denso micelio con la presencia de esporangióforos y esporangios.....	111
<b>6:2</b>	Árbol filogenético inferido a partir de 705 nucleótidos de la región LSU ADNr D1 y D2 de <i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>sexualis</i> CLBPZ-13 y otros aislados del género <i>Rhizopus</i> disponibles en el GenBank. Se utilizó el método de unión de vecinos con una prueba de arranque de 2.000 réplicas. Dos cepas de <i>Penicillium italicum</i> (CBS 496.75 y CBS 719.73) se emplearon como grupo externo.....	115
<b>6:3</b>	Características morfológicas de <i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>sexualis</i> CLBPZ-13. (a) colonia en PDA tras 4 días de incubación a 26 °C, (b) columela, (c) esporangiosporas, (d) esporangióforo, (e) ramificación umbeliforme del esporangióforo y (f) rizoides. Barra de escala: b, c = 10 µm; d, e = 100 µm y f = 20 µm.....	116
<b>6:4</b>	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial de <i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>sexualis</i> CLBPZ-13, agente causal de la podredumbre blanda de la calabaza butternut en PDA a 5, 15 y 25 °C.....	118
<b>6:5</b>	Test de patogenicidad de <i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>sexualis</i> CLBPZ-13 en calabaza butternut. (a) control tratado con agua en lugar de inóculo, (b) estado externo de la infección tras 3 días y (c) fruto con descomposición acuosa cubierto de micelio tras 6 días.....	120



## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>1:1</b>	Superficie, rendimiento y producción de las principales hortalizas cultivadas en España, 2020.....	2
<b>1:2</b>	Agentes causales de las principales enfermedades poscosecha de brócoli, melón y calabaza.....	10
<b>1:3</b>	Principales fungicidas de aplicación permitida durante el periodo de poscosecha en España.....	14
<b>3:1</b>	Datos de las secuencias de ADN identificadas en esta tesis.....	39
<b>4:1</b>	Pruebas fenotípicas realizadas a los diferentes aislados de bacterias seleccionadas, obtenidas del interior de la médula dañada de tallos florales de brócoli.....	58
<b>4:2</b>	Sintomatología desarrollada en las piezas del tallo de brócoli inoculados con <i>P. ultimum</i> BRSA-02 y las bacterias <i>P. putida</i> (aislado F) y <i>Ochrobactrum</i> sp. (aislado G).....	69
<b>5:1</b>	Características morfológicas del aislado MLFR-01 causante de la podredumbre de la fruta de melón galia y descripciones previas de <i>Fusarium solani</i> .....	90
<b>5:2</b>	Características morfológicas del aislado MLFR-03 causante de la podredumbre de la fruta de melón galia y descripciones previas <i>Fusarium brachygibbosum</i> .....	92
<b>5:3</b>	Características morfológicas del aislado MLFR-07 causante de la podredumbre de la fruta de melón cantalupo y descripciones previas <i>Fusarium equiseti</i> .....	94
<b>5:4</b>	Características morfológicas del aislado MLFR-09 causante de la podredumbre de la fruta de melón cantalupo y descripciones previas <i>Fusarium annulatum</i> .....	95

<b>5:5</b>	Prueba de patogenicidad e índice de severidad de la enfermedad causada por diferentes aislados de <i>Fusarium</i> en frutos de melón galia ( <i>Cucumis melo</i> var. <i>reticulatus</i> ) y cantalupo ( <i>Cucumis melo</i> var. <i>catalupensis</i> ).....	99
<b>6:1</b>	Secuencias de ADN que fueron usadas para el análisis filogenético molecular de <i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>sexualis</i> CLBPZ-13.....	113
<b>6:2</b>	Características morfológicas del aislado <i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>sexualis</i> CLBPZ-13 causante de la pudrición de la calabaza butternut y especies relacionadas.....	117

## CAPÍTULO 1

---

### Introducción general

#### **1.1. Importancia de los cultivos hortícolas en el sudeste español**

La producción hortícola en el sudeste de España representa un sector estratégico, siendo una de las principales fuentes de riqueza de su economía (Proexport, 2021). La Región de Murcia fue la tercera comunidad autónoma con mayor volumen de producción de hortalizas en España durante 2019 (Statista, 2019).

Parte de esta producción tiene como destino el mercado exterior; siendo Andalucía, la Comunidad Valenciana y la Región de Murcia las más importantes comunidades exportadoras de frutas y hortalizas frescas. En el año 2020, se movilizaron 13,09 millones de toneladas de estos productos, lo que supuso unos ingresos totales de 14.594 millones de euros para los productores hortofrutícolas españoles. Dado el alto número de exportaciones, la Región de Murcia y Almería se han afianzado como la huerta de Europa. Los principales países importadores son Alemania, Francia y Reino Unido (FEPEX, 2020).

Estas cifras han sido especialmente representativas ante una campaña, la de 2020, marcada por la pandemia mundial que aún nos golpea y por las dificultades que fueron necesarias paliar para abastecer a una población confinada, donde resalta la importante labor de aquellos que con rigor pusieron al servicio de la sociedad lo esencial y cotidiano ante un escenario extremadamente difícil (CARM, 2020).

##### **1.1.1. Superficies y producciones de cultivos hortícolas**

De acuerdo con la estadística provisional agraria de 2020, se destinaron 386.084 ha al cultivo de hortalizas en España, con una producción total de 15.180.448 t. En la tabla 1.1 se recogen los 10 principales cultivos hortícolas a nivel nacional (MAPAMA, 2020):

**Tabla 1.1.** Superficie, rendimiento y producción de las principales hortalizas cultivadas en España, 2020.

Hortaliza	Superficie (ha)	Rendimiento (kg/ha)	Producción (t)
Tomate	55.468	173.496	4.312.895
Lechuga	34.005	75.888	961.938
Brócoli	31.967	44.087	527.915
Ajo	27.937	13.291	269.094
Cebolla	24.608	106.588	1.299.723
Sandía	21.617	123.641	1.234.850
Pimiento	21.587	124.487	1.469.969
Melón	18.517	84.523	610.978
Guisantes Verdes	16.020	33.154	120.165
Espárrago	14.215	13.646	65.094

En orden de importancia, las mayores áreas productoras fueron Andalucía, Extremadura y Región de Murcia; comunidades autónomas de las que se obtiene más del 65% de la producción hortícola final (MAPAMA, 2020). De las 369.516 ha destinadas a tierras de cultivo en la Región de Murcia, según los datos oficiales del anuario de estadística de 2020, las hortalizas ocuparon 54.847 ha (CARM, 2020).

Las principales zonas productoras hortícolas de la Región de Murcia, se extienden en su mayor parte por el Campo de Cartagena y el Valle del Guadalentín (CARM, 2020). La Región de Murcia es la principal comunidad productora de brócoli en España, con una producción total de 192.514 t en el pasado año 2020 (MAPAMA, 2020).

Según los últimos datos de la FAO, España es el cuarto país productor de coliflor y brócoli a nivel mundial, lo que le hace ocupar la primera posición en la Unión Europea, por delante de países como Italia, Francia y Polonia (FAO, 2019).

Para otros productos como el melón, España es el quinto país que más produce en el mundo; el 50% de esta producción tiene su origen en Andalucía y la Región de Murcia (FAO, 2019; MAPAMA, 2020).

Todos estos datos aportan valor a la producción hortícola en el sudeste de España y refuerzan la importancia de conocer las técnicas más apropiadas para obtener los mejores rendimientos, garantizando la máxima calidad del producto que se suministra al mercado.

## **1.2. Almacenamiento de frutas y hortalizas**

La mayor parte de las modificaciones físico-químicas que tienen lugar durante el almacenamiento de los productos cosechados están relacionados con el metabolismo oxidativo, factor que va a determinar el cambio en la calidad y la duración del periodo de almacenamiento (Rahman *et al.*, 2013).

El metabolismo oxidativo es una consecuencia del proceso respiratorio, ya que es la temperatura uno de los factores más influyentes en este proceso. La supervivencia comercial de los productos hortofrutícolas frescos depende en gran medida de este factor ambiental, pues ejerce efectos decisivos sobre la velocidad de los procesos fisiológicos (Thompson, 2003). Si se llevan a cabo prácticas culturales adecuadas y una correcta manipulación del vegetal durante el almacenamiento, sus defensas naturales experimentan un efecto positivo que les permite protegerse de los patógenos (Romanazzi *et al.*, 2016). Además, este tipo de procedimientos tienen un impacto beneficioso en la economía y la sociedad, teniendo en cuenta que de 1.300 millones de toneladas de alimentos que se pierden a nivel mundial, el 40% son de frutas y verduras (Jiang *et al.*, 2020). De acuerdo con Kader (2012), tan solo se destina el 5% del total de recursos que se invierte en la producción de alimentos a la conservación poscosecha de los mismos.

Entre los métodos físicos de almacenamiento más adecuados para mantener y reforzar las defensas del hospedero destacamos la refrigeración, las atmósferas modificadas y controladas, los tratamientos térmicos, la radiación ultravioleta y los tratamientos hipobáricos e hiperbáricos.

### **1.2.1. Conservación refrigerada**

La conservación a baja temperatura es el método más eficaz y frecuentemente empleado en este campo, no solo por proporcionar una mayor variedad de productos a los consumidores, sino porque también facilita la disponibilidad de determinados alimentos en áreas que no los producen, sin limitaciones estacionales (Liu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021a). Con la refrigeración de frutas y verduras conseguimos retardar la producción de calor respiratorio, la maduración, el marchitamiento como consecuencia de la pérdida de humedad y el deterioro debido a la proliferación de hongos



filamentosos, bacterias y levaduras; en definitiva, se logra minimizar el desperdicio de alimentos (Becker y Fricke, 1996; Holsteijn y Kemna, 2018).

Autores como Snowdon (1991) recomendaron para algunos productos como el brócoli, el melón y la calabaza las siguientes condiciones de almacenamiento refrigerado:

- Entre 0-1 °C y 95-100% de HR, durante 1-2 semanas (brócoli).
- En melón galia 6 °C y para cantalupo entre 4-5 °C y 90% de HR, durante 1-3 semanas.
- Para calabaza sobre 10-13 °C y 60-70% de HR, durante 2-5 meses.

Algunos estudios han demostrado que la conservación refrigerada de la fruta de melón permite detener temporalmente la producción de etileno, hormona responsable de acelerar la maduración y de reducir la vida poscosecha de los productos hortofrutícolas (Dunlap *et al.*, 1990). Para un almacenamiento simulado a temperatura ambiente de 20 °C y 60% de HR, la vida útil del brócoli se redujo drásticamente de uno a dos días (Mercantilia, 1989).

La completa integridad del producto vegetal y el riguroso control de la temperatura desde la cosecha hasta el consumo, son dos factores importantes que permiten alargar el almacenamiento y la vida útil de las frutas y verduras frescas en condiciones saludables (Barth *et al.*, 2009).

### **1.2.2. Atmósferas modificadas (AM) y controladas (AC)**

Las tecnologías de envasado en atmósfera modificada (AM) y almacenamiento en atmósfera controlada (AC) se utilizan para alargar la vida útil de frutas y verduras (Aguayo *et al.*, 2007). Con ambas técnicas conseguimos retrasar la maduración de los productos vegetales al disminuir el nivel de O<sub>2</sub> y aumentar el nivel de CO<sub>2</sub> respecto al aire normal (Bodbodak y Moshfeghifar, 2016). Estas variaciones gaseosas ralentizan la tasa de respiración del producto, lo que retrasa la senescencia y el deterioro del mismo; además, también se limita así el crecimiento microbiano (Paulsen *et al.*, 2018).

Para la tecnología de AM, el producto se envasa en una película plástica. La reducción del O<sub>2</sub> o los niveles elevados de CO<sub>2</sub> en el interior del paquete, pueden reducir la producción de etileno, retrasar el ablandamiento y ralentizar varios cambios en la composición relacionados con la maduración (Park *et al.*, 2020). La permeabilidad del

paquete, la respiración del producto y el riguroso control de la temperatura y la humedad relativa, son los principales factores de interacción a considerar para garantizar la fiabilidad del envasado en AM (Tano *et al.*, 2007; Paulsen *et al.*, 2018).

Con ambas técnicas se han obtenido muy buenos resultados en el almacenamiento y conservación del brócoli (Fernández-León *et al.*, 2013; Paulsen *et al.*, 2018), el melón (Portela y Cantwell, 1998; Verás *et al.*, 2019) y la calabaza (Boyhan *et al.*, 2012; Stefanov *et al.*, 2012).

### **1.2.3. Tratamientos térmicos**

Este tipo de tratamientos se utilizan para la desinfección de una gran variedad de cultivos, incluyendo frutas, verduras y flores (Lurie, 1998). Los tratamientos térmicos eliminan insectos, protegen las frutas y verduras contra la incidencia de enfermedades y, en último término, mejoran la calidad de los productos durante el almacenamiento (Lurie y Pedreschi, 2014).

Los tratamientos poscosecha con calor se utilizan solo durante cortos períodos de tiempo, de 3 a 5 minutos, porque los patógenos suelen estar en la superficie de los tejidos, o como mucho, en las primeras capas celulares; por ello, no es necesario que el calor alcance todo el tejido. Existen diferentes formas de aplicación del calor: por inmersión en agua caliente, mediante vapor de calor o con aire seco caliente (Fallik, 2004). El mecanismo de acción del calor en el control de las enfermedades está relacionado tanto con efectos directos sobre el patógeno, como con efectos indirectos sobre el huésped al estimular la expresión de genes asociados con la defensa, tales como fenilalanina amonio liasa, quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa (Usall *et al.*, 2015).

La elección de la temperatura y tiempo de tratamiento adecuado depende fundamentalmente del tipo de cultivo, de las condiciones dadas durante el periodo de crecimiento, de la madurez y del tamaño de la fruta (Aghdam y Bodbodak, 2014). Pueden variar desde días a 35-39 °C en aire caliente, hasta 63 °C menos de un minuto en agua caliente (Lurie y Pedreschi, 2014). La aplicación de agua caliente a 50 °C durante 3 min en brócoli permitió que retuviera la mayor parte de su color verde, evitando las tonalidades amarillas propias de la senescencia (Perini *et al.*, 2017). Un tratamiento térmico inadecuado puede producir escaldaduras en la piel y ablandamiento del

producto (Paull y Chen, 2000).

En los últimos años, se ha incrementado el uso del calentamiento por microondas y la radiofrecuencia, con el objetivo de lograr tratamientos térmicos más rápidos y efectivos (Marra *et al.*, 2009; Chandrasekaran *et al.*, 2013).

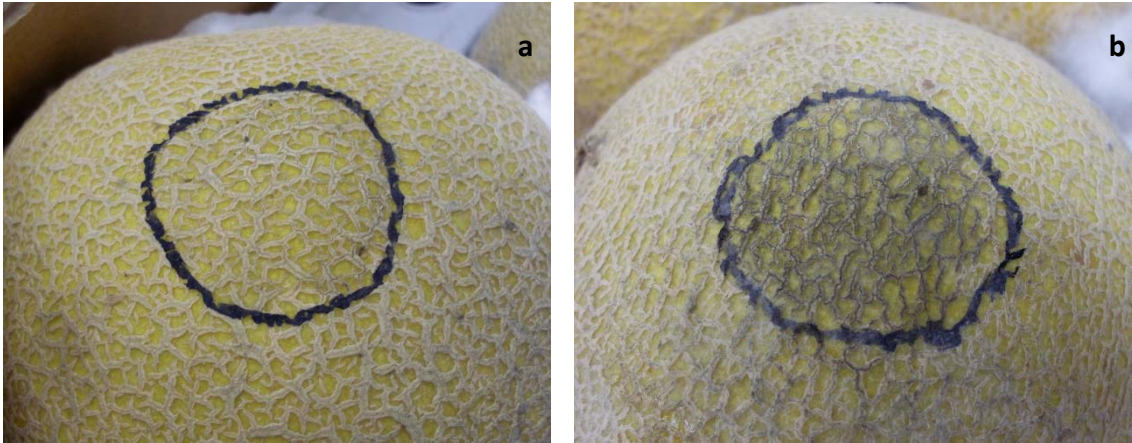
#### **1.2.4. Radiación ultravioleta-C**

La aplicación de luz UV-C (190-280 nm) puede reducir la incidencia de patógenos poscosecha por su poder germicida e inductor de resistencia en el huésped (Zhang y Jiang, 2019). La aplicación de dosis bajas de un agente nocivo permite generar un efecto beneficioso en la resistencia a las enfermedades, a través del fenómeno definido como “hormesis”. Si la luz UV-C se aplicara a dosis altas obtendríamos un efecto perjudicial y la esterilización superficial del producto (Usall *et al.*, 2016). De acuerdo con Civello *et al.* (2006), exponer las frutas y verduras a radiación UV-C nos permite ajustar su maduración y senescencia y activar los mecanismos de defensa, a través de la acumulación de fitoalexinas y la inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis, además de aumentar el valor nutricional. Los principales factores que determinan el resultado del tratamiento son la dosis total (energía por unidad de área) y la intensidad de la radiación (dosis por unidad de tiempo) (Cote *et al.*, 2013).

Lemoine *et al.* (2007) trataron brócoli mínimamente procesado con luz UV-C (8 kJ/m<sup>2</sup>) con un posterior almacenamiento a 4 °C durante 21 días, lo que redujo el daño tisular y el crecimiento microbiano, retrasó el amarilleo y la degradación de la clorofila y aumentó el contenido en ácido fólico, ascórbico y azúcares solubles. La radiación UV-C, también resultó eficaz en el control de la pudrición causada por *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* en melón (Huang *et al.*, 2015).

Nuestra experiencia en este campo, fruto de los estudios que hemos realizado, nos indica que una radiación de 7 kJ/m<sup>2</sup> durante 8 segundos es capaz de retardar la germinación y el desarrollo de determinadas podredumbres en melón galia. Este efecto lo pudimos comprobar con la especie *Cladosporium cladosporioides* que hemos detectado, siendo un patógeno muy importante en la colonización de la zona del escriturado de los frutos (Figura 1.1). Conseguimos alargar la fase de latencia del hongo en el fruto tratado (Figura 1.1a) en relación con el testigo sin irradiar, que se desarrolló

a una tasa de crecimiento mayor (Figura 1.1b). El uso de la luz UV-C como método físico de control ofrece varias ventajas, ya que es sencillo de usar, no deja residuos en los alimentos y es letal para la mayoría de los tipos de microorganismos (Turtoi, 2013).



**Figura 1.1.** Efecto de la radiación UV-C sobre el desarrollo de *Cladosporium cladosporioides* inoculado a zonas del escriturado de melón galia demarcadas en círculos con rotulador. (a) fruto irradiado y (b) testigo.

### 1.2.5. Tratamiento hipobárico e hiperbárico

Los métodos hipobárico e hiperbárico son dos técnicas basadas en aplicar durante un corto periodo de tiempo una presión superior o inferior a la atmosférica (0,1 MPa). Ambos tratamientos previenen del daño celular y reducen la producción de etileno, el crecimiento microbiano y la respiración (Liamnimitr *et al.*, 2018). Tienen efecto sobre los tejidos del huésped sin causar alteraciones directas en el patógeno (Romanazzi *et al.*, 2016).

Con el método hiperbárico los productos se someten a un ambiente de aire presurizado (0,1 a 1,0 MPa) en el que se aumenta la presión total, manteniendo la misma proporción de la composición del aire (Liplap *et al.*, 2014). Es un tratamiento que actúa de forma uniforme e instantánea en la totalidad el producto, independientemente de la fisiología del mismo (Goyette *et al.*, 2007). La aplicación de presión hiperbárica en el rango de 0,25 a 0,85 MPa permitió reducir el desarrollo de *Botrytis cinerea* (Romanazzi *et al.*, 2008) y *Pseudomonas cichorii* (Liplap *et al.*, 2014). Este efecto puede deberse a la condición de estrés leve que induce resistencia en la fruta, a la toxicidad causada por los niveles altos de O<sub>2</sub> o al efecto directo de la presión (Liplap *et al.*, 2014).

El tratamiento hipobárico es similar al almacenamiento en atmósfera controlada (AC).

Al disminuir la presión total de los gases componentes, conseguimos una reducción de la presión parcial de O<sub>2</sub>, principal molécula de gas que afecta a la calidad en la conservación de los productos frescos; lo que produce un efecto directo sobre la tasa de respiración y la producción de etileno (Liamnimitr *et al.*, 2018). Se ha demostrado la inhibición del crecimiento de microorganismos como *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* mediante este método (Hashmi *et al.*, 2013).

Los métodos de almacenamiento futuros buscan reducir el gasto de energía y la presencia de residuos en el producto para satisfacer el consumismo ecológico de alimentos con elevado nivel nutricional, sin aditivos artificiales y de calidad que demandan los usuarios (Jiang *et al.*, 2020).

### **1.3. Enfermedades de las frutas y hortalizas durante la postrecolección**

Los patógenos responsables de la infección vegetal pueden introducirse en la propia semilla, a lo largo del crecimiento del cultivo en el campo, en el momento de la cosecha y período poscosecha o durante el almacenamiento y distribución (Barth *et al.*, 2009).

#### **1.3.1. Factores que influyen en el desarrollo de la infección**

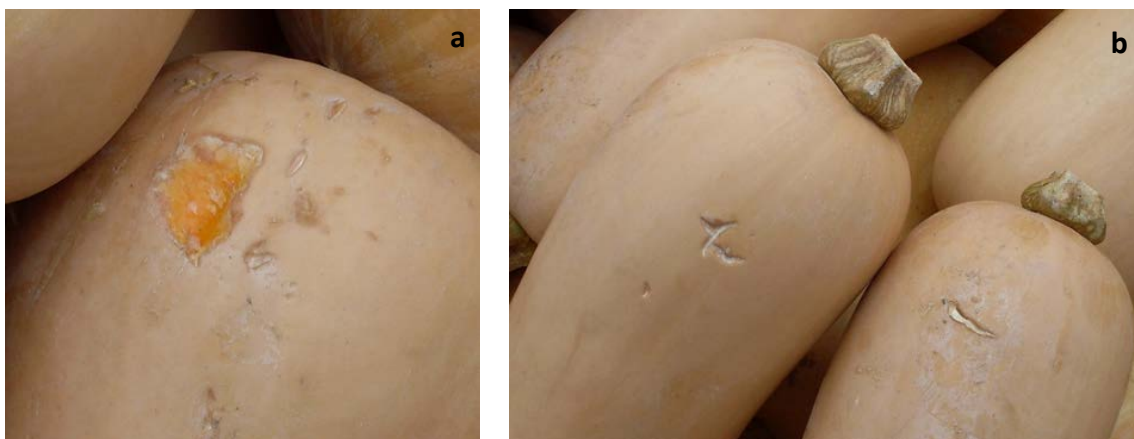
El ambiente que se dé en el entorno del producto es un factor importante en el desarrollo de la infección por microorganismos. En la descomposición y subsiguiente desecho poscosecha del producto la alta temperatura, la humedad y la composición del aire (especialmente las concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) permiten controlar la senescencia y contener el crecimiento de los patógenos (Barkai-Golan, 2005; Nabi *et al.*, 2017).

La supervivencia comercial de los productos vivos viene condicionada en buena parte por su fase de cultivo. Los factores precosecha que afectan al desarrollo de la enfermedad en poscosecha son: el clima, tipo de cultivo, material de siembra y prácticas culturales (aplicación de riego, fertilización, pesticidas, poda, densidad de cultivo, etc.) (Coates *et al.*, 1997). Los parásitos débiles pueden encontrar una vía de acceso a las frutas y verduras antes de la cosecha, por ejemplo, a través de lenticelas, aberturas naturales como los estomas y fisuras de crecimiento que se producen en la cutícula. En este contexto, es posible que la infección no se desarrolle hasta que disminuya la resistencia del huésped ante el organismo invasor o las condiciones sean favorables para

el crecimiento del patógeno, es decir, cuando la fruta comience a madurar o sus tejidos pasen a estar senescentes (Nabi *et al.*, 2017; Singh y Sharma, 2018).

Existen otros factores que influyen en el desarrollo de la infección de frutas y verduras. Por ejemplo, las pudriciones bacterianas son más comunes en las verduras porque la mayor parte de estas tienen un pH > 4,5. La piel de la fruta ejerce de medio selectivo ante los posibles ataques fúngicos a los que se vea expuesta. Las frutas con un avanzado estado de maduración son más susceptibles a la infección y el desecho que las inmaduras (Singh y Sharma, 2018); esto se debe principalmente a su alto contenido de humedad y nutrientes, así como a la desprotección de los factores intrínsecos que les otorgaban resistencia durante su proceso de desarrollo (Nabi *et al.*, 2017).

Las heridas que sufren frecuentemente los frutos durante la cosecha y almacenamiento suponen una vía de invasión para las esporas de los hongos (Snowdon, 1991). Al contrario de los patógenos que atacan en el campo, la mayor parte de los patógenos poscosecha requieren de una herida para poder introducirse a través de la cutícula del fruto (Nunes, 2012). Se pueden dar diferentes tipos de lesiones: mecánicas (cortes, abrasiones y magulladuras), químicas (quemaduras), biológicas (aves, insectos y roedores) y fisiológicas (daños por frío o calor) (Coates *et al.*, 1997). La descuidada colocación y el sobrellenado del embalaje de almacenamiento pueden causar daños en frutos de calabaza butternut (Figura 1.2a); esto se debe especialmente a la dureza del pedúnculo tras su secado en campo. Las heridas cicatrizadas son menos propensas a la invasión por hongos (Figura 1.2b).



**Figura 1.2.** Daños mecánicos en calabaza butternut como consecuencia del sobrellenado del embalaje de almacenamiento. (a) herida fresca y (b) herida cicatrizada.

### 1.3.2. Patógenos que causan enfermedades poscosecha

Las principales pérdidas en el periodo poscosecha de frutas y verduras son debidas a patógenos fúngicos, aunque también existen bacterias capaces de causar enfermedad durante esta etapa (Singh y Sharma, 2018). Destacan especies de hongos pertenecientes a *Fusarium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Monilinia*, *Neofabraea*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Phomosis*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia* entre otros, y bacterias como *Erwinia* (*Petobacterium*), *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Xanthomonas* (Coates *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 2008; Nabi *et al.*, 2017). Algunos de los hongos citados, no solo echan a perder los alimentos, sino que también pueden constituir un riesgo de seguridad al producir micotoxinas y otros metabolitos encargados de ocasionar reacciones adversas en humanos y animales (Sellitto *et al.*, 2021).

De acuerdo con Singh y Sharma (2018), se especifican a continuación los principales patógenos poscosecha que pueden causar enfermedad a los productos vegetales estudiados en este trabajo (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Agentes causales de las principales enfermedades poscosecha de brócoli, melón y calabaza.

Nombre común	Patógeno	Producto afectado
Podredumbre blanda bacteriana	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> y <i>Erwinia</i> sp.	Brócoli, calabaza
Podredumbre blanda bacteriana	<i>Pseudomonas syringae</i>	Brócoli, melón
Podredumbre seca o blanda	<i>Fusarium</i> sp.	Melón, calabaza
Mancha oscura, fumagina	<i>Alternaria alternata</i>	Brócoli
Podredumbre gris	<i>Botrytis cinerea</i>	Brócoli, melón, calabaza
Podredumbre verde oliva, fumagina	<i>Cladosporium herbarum</i>	Melón
Podredumbre rosa	<i>Trichothecium roseum</i>	Melón
Podredumbre blanda acuosa	<i>Sclerotinia</i> sp.	Brócoli, melón, calabaza
Podredumbre blanda acuosa	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Calabaza

Varios de los patógenos que aparecen durante los periodos previos a la cosecha pueden afectar a la calidad del producto durante la poscosecha, tal es el caso, por ejemplo, de

*Botrytis cinerea* (Morales-Cedeño *et al.*, 2021), capaz de incidir en muchas áreas debido a su amplia variedad de huéspedes (Dean *et al.*, 2012).

Un patógeno frecuente de heridas superficiales es *Rhizopus stolonifer*, que causa la podredumbre blanda acuosa, infección que afecta a una extensa gama de frutas y verduras, y cuya propagación es muy rápida (Bautista-Baños *et al.*, 2014).

Puede darse que un mismo producto sea atacado por varios microorganismos simultáneamente (Figura 1.3). El resultado es una descomposición progresiva que afecta a todo el vegetal (Snowdon, 1991).



**Figura 1.3.** Podredumbre mixta causada por diferentes especies fúngicas. (a) melón y (b) calabaza.

Algunas de estas enfermedades pueden reducir el valor del producto sin que llegue a ser inservible, es decir, puede que no se venda como fruta fresca, pero sí para su procesamiento, reduciendo su valor económico (Coates *et al.*, 1997).

### **1.3.3. Modo de infección**

Existen varias etapas en el ciclo de vida de los hongos patógenos de frutas y verduras, desde que las esporas entran en contacto con la superficie del huésped, la infección y el desarrollo de síntomas de descomposición (Prusky, 1996). Las tres principales rutas de entrada que tienen los hongos patógenos poscosecha para penetrar en el tejido del huésped son: (a) por medio de las heridas ocasionadas por agentes bióticos y/o abióticos a lo largo del crecimiento y almacenamiento; (b) por medio de aberturas naturales del espacio pedicelo-fruto, lenticelas y extremos del tallo y (c) a través de la cutícula del



huésped por las roturas que tienen lugar durante el crecimiento de la fruta (Prusky y Lichter, 2008).

El patógeno, a través de sus esporas, tiene que adherirse al tejido, germinar, desarrollar estructuras de penetración o penetrar a través de las heridas y desencadenar una serie de factores de patogenicidad que liberan nutrientes imprescindibles para mantener su desarrollo y descomponer los tejidos del huésped (Prusky, 1996). Los conidios germinan en la superficie del tejido del huésped dando como resultado la producción de un tubo germinativo y un apresorio. Puede que el hongo se comporte de forma diferente en función del hospedador, pero si las condiciones no son favorables, permanecerá en estado inactivo hasta que cese el mecanismo o las moléculas de defensa que protegen la fruta del ataque de hongos (Coates *et al.*, 1997; Prusky y Lichter, 2008).

Las enfermedades poscosecha se pueden clasificar según el momento en el que tiene lugar la infección. Se consideran infecciones inactivas o latentes, aquellas en las que el patógeno inicia la infección en el huésped normalmente antes de la cosecha y se mantiene inactivo o latente hasta que el estado fisiológico del huésped experimente cambios durante la maduración, momento en el que se reactiva la infección (Coates *et al.*, 1997). Es durante la senescencia cuando el huésped experimenta cambios en el pH, contenido de azúcar y componentes de la pared celular, lo que desencadena respuestas en el patógeno. La alcalinización del tejido por amoníaco o acidificación por ácidos orgánicos y el posible ajuste de la respuesta de especies reactivas de oxígeno (ROS) del huésped y producción de ROS por el patógeno, puede favorecer la necrosis de los tejidos (Prusky y Lichter, 2008).

Un hongo puede estar en estado quiescente tras el proceso de infección. Durante la germinación puede desarrollar inicialmente hifas, formar apresorios y elongar el tubo germinativo (Prusky, 1996). La ausencia de germinación o avance a etapas posteriores depende de las condiciones adversas que imponga temporalmente el huésped, que pueden afectar directamente al patógeno o indirectamente a su capacidad patógena (Nabi *et al.*, 2017).

Otro grupo de infecciones, son las que se inician durante o tras la cosecha; en este caso, el factor desencadenante es la existencia de heridas superficiales que no necesariamente tienen que ser visibles (Coates *et al.*, 1997). Las frutas y verduras sanas

pueden impedir el crecimiento de estos organismos, considerados patógenos débiles durante un tiempo considerable (Singh y Sharma, 2018). El corte del extremo del pedúnculo del fruto es un punto de entrada frecuente de microorganismos; las pudriciones que se producen como consecuencia de esta incisión, son una de las formas más importante de deterioro poscosecha (Barkai-Golan, 2005). Las partes florales de las plantas (pétalos, sépalos, estigmas, etc.) son otra de las zonas sensibles que posibilitan el inicio de la infección (Nabi *et al.*, 2017).

### **1.4. Problemática del diagnóstico en poscosecha y gestión de tratamientos de control**

A pesar de toda la investigación que se está llevando a cabo para controlar las enfermedades de las plantas y de la industria encargada de producir y comercializar estos sistemas, las pérdidas de producto por enfermedades continúan siendo muy elevadas (Agrios, 2000; García-Arenal y Fraile, 2000). La precisa identificación del organismo que causa la infección es imprescindible para seleccionar una adecuada estrategia de gestión y control de la enfermedad (Coates *et al.*, 1997).

Los cambios climáticos actuales pueden alterar la supervivencia y el crecimiento de los patógenos vegetales, así como sus fuentes y formas de transmisión; estos efectos repercuten en la conocida triada epidemiológica, representada por el agente causal, el huésped y medio ambiente (Misiou y Koutsoumanis, 2021). La introducción de patógenos o huéspedes en diferentes áreas, lleva consigo nuevas interacciones, en las que puede ser especialmente importante su diagnóstico. La detección de enfermedades en estados iniciales permite superarlas y gestionarlas de forma adecuada. Este procedimiento requiere de una correcta identificación de la enfermedad por parte de un experto que describa los métodos de tratamiento y control que se deben adoptar (Abu-Naser *et al.*, 2008). Generalmente, la infraestructura empresarial hortofrutícola carece de los medios y recursos materiales necesarios para hacer una buena caracterización y diagnóstico fitosanitario, no estando exento de conclusiones erróneas y repetitivas; hasta incluso con enfermedades que indiquen frecuentemente. Ante la

ausencia de un diagnóstico fitopatológico exacto, el abordaje de la prevención y el control de la enfermedad es ineficaz o incompleto (Martínez y Parra, 2017).

#### 1.4.1. Tratamientos químicos poscosecha

Los agentes químicos sintéticos son el principal medio de control de las enfermedades tras la cosecha (Nunes, 2012). A nivel de España, para conocer los fungicidas y bactericidas cuyo uso está permitido en poscosecha, hay que recurrir al registro de productos fitosanitarios del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA, 2021). Como se puede comprobar en la tabla 1.3, de acuerdo con el propio registro nacional, no se contempla la aplicación directa de productos químicos durante este periodo para el control de enfermedades en hortícolas.

**Tabla 1.3.** Principales fungicidas de aplicación permitida durante el periodo de poscosecha en España.

Sustancia activa	Uso	Agente
Pirimetanil	Frutos cítricos, frutos de hueso y frutos de pepita	<i>Penicillium, Monilia, Rhizopus, Botrytis, Neofabraea, Alternaria</i>
Fludioxonil	Frutos cítricos, frutos de pepita y frutos de hueso	<i>Rhizopus, Penicillium, Monilia, Botrytis, Colletotrichum, Neofabraea</i>
Imazalil	Frutos cítricos, semillas y bulbos	<i>Penicillium, Alternaria, Fusarium, Verticillium</i>
Tiabendazol	Frutos cítricos, manzanas, peras y plátanos	<i>Botrytis, Penicillium, Fusarium, Neofabraea</i>
2-fenilfenol	Frutos cítricos	<i>Trichoderma, Cladosporium, Alternaria, Aspergillus, Penicillium, Rhizopus</i>
Fosetil-al	Frutos cítricos	<i>Phytophthora</i>

En melón, solo se reconoce el uso del 1-metilciclopropeno (1-MCP), no como fungicida, sino como regulador del crecimiento. Su aplicación, en formato gas, bloquea y evita la unión del etileno a sus receptores, lo que permite mejorar la calidad y extender la vida útil poscosecha del vegetal tratado (Baswal y Ramezani, 2021). De acuerdo con los últimos estudios publicados, el tratamiento con 1-MCP mejoró la firmeza y la pérdida de peso en cantalupo (García-Robles *et al.*, 2016).

Esta inexistencia de sustancias activas autorizadas viene condicionada por el uso intenso y en la mayoría de los casos impreciso de fungicidas que tratan de controlar las enfermedades durante esta fase, lo que ha contribuido a la aparición de resistencias

(Mari *et al.*, 2014). Tal es el caso de determinados aislados de *Penicillium digitatum* y *P. italicum* resistentes al imazalil, tiabendazol y 2-fenilfenol (Kinay *et al.*, 2007; Erasmus *et al.*, 2015) o de aislados de *Botrytis cinerea* resistentes al pirimetanil que fueron evaluados en España (Diáñez *et al.*, 2002).

Además, dado que la aplicación química se produce en la fase previa a la distribución y consumo del alimento, existe una mayor probabilidad de exposición humana directa de estos productos químicos; especialmente si se compara con aquellos que se aplican durante el cultivo, donde los plazos de seguridad pueden ser más extensos (Tripathi y Dubey, 2004). Los residuos químicos de los productos tratados derivan en daños para la salud humana, que van desde impactos a corto plazo (dolores de cabeza y náuseas) a impactos crónicos (daño reproductivo, cáncer y alteración endocrina) (Parveen *et al.*, 2002).

Los estudios actuales se centran en buscar alternativas efectivas y seguras a los tratamientos químicos sintéticos para evitar las pérdidas poscosecha de frutas y hortalizas (Wisniewski *et al.*, 2016).

### **1.4.1.1. Métodos de higienización y desinfección**

Ante las limitaciones en el empleo de fungicidas químicos se está extendiendo el uso de desinfectantes agrícolas con actividad antimicrobiana que aumenten la vida útil, seguridad y calidad de los productos frescos. En aquellas hortalizas que se cultivan directamente en contacto con el suelo, como puede ser el melón, el uso de desinfectantes es fundamental para disminuir el riesgo de contaminación cruzada de patógenos durante el lavado del producto (Rothwell *et al.*, 2021). Los principales desinfectantes agrícolas con actividad antifúngica y antibacteriana usados en el agua de lavado son a base de cloro, aunque cada vez se está extendiendo más el uso de desinfectantes a base de ácido peroxiacético y ozono (Sapers, 2001; Ruiz-Cruz *et al.*, 2007; Tzortzakis y Chrysargyris, 2017).

La inmersión en agua ozonizada puede valorarse como un tratamiento alternativo y eficaz de esterilización frente al crecimiento microbiano (Botondi *et al.*, 2021). Su aplicación en brócoli redujo la contaminación microbiana sin alterar los atributos sensoriales o de calidad del producto recién cortado (Renumarn *et al.*, 2014). Tampoco

afectó a su contenido bioquímico (flavonoides, vitamina C, polifenoles, clorofila y capacidad antioxidante) (Lima *et al.*, 2014).

Por otro lado, los desinfectantes de ácido peroxiacético ( $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$ ) son una buena opción frente al cloro; están disponibles comercialmente en una mezcla que incluye peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y ácido acético ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) (Kitis, 2004). Su uso está permitido en las industrias de alimentos orgánicos y aunque tienen un coste superior a los desinfectantes a base de cloro, su actividad se ve menos alterada ante la presencia de materia orgánica y diferentes rangos de temperatura y pH del agua (Dell'Erba *et al.*, 2007; Banach *et al.*, 2015; Teng *et al.*, 2018).

En las últimas décadas, se ha popularizado el uso del agua electrolizada como método desinfectante contra patógenos bacterianos y fúngicos poscosecha, al trabajar en un amplio rango de pH (Ippolito *et al.*, 2021). Además, con este tratamiento conseguimos reducir los residuos de fitosanitarios en frutas y verduras sin comprometer sus propiedades organolépticas; retrasando incluso la senescencia, reduciendo el pardeamiento y aliviando los daños por frío (Hao y Wang, 2019). El agua electrolizada es sostenible y económica. Para su producción se emplea agua de abastecimiento y diferentes sales que no tengan un alto contenido en cloro. Frecuentemente se utiliza NaCl como electrolito, dadas sus excelentes propiedades de limpieza y desinfección (Zhang *et al.* 2021b). La eficacia del uso de este método depende principalmente de la concentración y del electrolito, y de la dureza y temperatura del agua (Rahman *et al.*, 2016).

#### **1.4.2. Control biológico**

Desde hace años, se ha avanzado con éxito en el control biológico de las enfermedades como tratamiento alternativo eficaz de la enfermedad en poscosecha, frente a los productos químicos sintéticos (El-Ghaouth, 1997; Zhang *et al.*, 2018). Las alternativas iniciales de aplicar elevadas concentraciones de agentes de control biológico a los productos cosechados han sido modificadas en la actualidad por la estrategia de utilizar una amplia gama de diferentes alternativas e integrarlas juntas hacia un enfoque basado en el obstáculo múltiple, que puede requerir de varias intervenciones en los diferentes puntos del proceso de la enfermedad (Wisniewski *et al.*, 2016). La mayoría de los

investigadores recomiendan combinar dos a más agentes de biocontrol para el control de las enfermedades tras la cosecha (Zhang *et al.*, 2018).

#### **1.4.2.1. Microorganismos antagonistas**

La nueva era del control de las enfermedades basa su fundamento en la biología, siendo necesaria la caracterización de los microbiomas existentes en los diferentes productos vegetales (Droby y Wisniewski, 2018). La utilización de microorganismos vivos para disminuir y/o mantener la población de fitopatógenos es una estrategia efectiva en el control de las enfermedades poscosecha que causan pérdidas económicas (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). La tasa de efectividad contra la enfermedad está condicionada por varios factores: el estado fisiológico del producto recolectado, su sensibilidad a patógenos específicos y las dificultades relacionadas con la producción y formulación del microorganismo antagonista, especialmente bajo condiciones comerciales (Droby *et al.*, 2016).

Existen bacterias, hongos filamentosos y levaduras con actividad antagonista de los patógenos que ocasionan el deterioro de las frutas y hortalizas después de la cosecha (Lima *et al.*, 2008). Sus mecanismos de actuación pueden ser diferentes: competencia por nutrientes y espacio, inducción de resistencia en el huésped, producción de sustancias antimicrobinas y parasitismo (Nunes, 2012). Entre los principales microorganismos con actividad antagonista que se pueden aplicar antes o después de la cosecha destacamos: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Candida oleophila*, *Candida sake*, *Cryptococcus albidus*, *Metschnikowia fructicola*, *Aurobasidium pullulans* y *Bacillus amyloliquefaciens* (Feliziani y Romanazzi, 2013).

El grupo investigador de Fitopatología de la UPCT ha caracterizado microorganismos antagonistas naturales que forman parte de las comunidades superficiales de frutos de calabaza butternut, con efecto antimicrobiano sobre diferentes patógenos fúngicos (Figura 1.4). Tal y como sugiere Nunes (2012), para el desarrollo de este tipo de ensayos de eficacia, se tuvieron en cuenta varios factores relacionados con la enfermedad; tales como: patógeno, huésped, condiciones ambientales en las que el agente de biocontrol iba a ser usado, epidemiología de la enfermedad y resistencia inducida o constituida del huésped.



**Figura 1.4.** Ensayos de eficacia de microorganismos con actividad antagonista contra patógenos fúngicos poscosecha de calabaza butternut. (a) antagonista *Bacillus licheniformis* contra *Alternaria* sp., (b) antagonista *Bacillus licheniformis* contra *Botrytis cinerea*, (c) antagonista *Rhodotorula mucilaginosa* contra *Fusarium* sp.

### 1.4.3. Compuestos naturales

Los aceites esenciales y extractos de plantas pueden desempeñar un papel importante en la conservación de los alimentos. Son sustancias generalmente reconocidas como GRAS (“Generally Recognized as Safe Compounds”) por “United States Food and Drug Administration” (US-FDA), o como aditivos alimentarios por “European Food Safety Authority” (EFSA) que presentan un bajo impacto ambiental y son seguras para la salud humana (Antunes y Cavaco, 2010).

#### 1.4.3.1. Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) se secretan y almacenan en los tricomas glandulares de las plantas aromáticas y son capaces de inhibir el desarrollo microbiano (Jiménez-Reyes *et al.*, 2019). Están compuestos por una mezcla de metabolitos secundarios volátiles que son bioactivos en estado vapor, presentan una acción directa contra fitopatógenos e incluso pueden mejorar los mecanismos de defensa de las plantas contra estos microorganismos (Palou *et al.*, 2016). Sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes y biodegradables los convierten en candidatos alternativos ideales como sustitutos de los fungicidas de síntesis (Sivakumar y Bautista-Baños, 2014). Debido a su naturaleza hidrófoba, causan alteraciones estructurales en la morfología de las hifas de los hongos y dividen la capa lipídica de la membrana celular, lo que altera su permeabilidad y provoca la fuga de componentes celulares esenciales (Mari *et al.*, 2016). Las condiciones climáticas, la edad de la planta y las prácticas agronómicas son algunos de los factores que más pueden influir en la efectividad de los tratamientos con AE, ya que afectan a la

composición y concentración de las sustancias activas que los constituyen (Telci y Sahbaz, 2005).

Destaca la actividad antifúngica de los AE de tomillo, orégano y clavo debido a su contenido de fenoles monoterpénicos; tales como el timol, carvacrol y eugenol que tienen una alta actividad antimicrobiana (Antunes y Cavaco, 2010; Ramos-García *et al.*, 2010).

Los últimos estudios publicados indican la efectividad de los AE de menta, tomillo y naranja en el control de *Rhizopus stolonifer* y *Fusarium* sp. (Rachitha *et al.*, 2017; Vilaplana *et al.*, 2018; Abo Elgat *et al.*, 2020; Rezende *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2021).

#### **1.4.3.2. Extractos de plantas**

La mayoría de los compuestos volátiles y AE comentados anteriormente deberían incluirse en este apartado. Aquí nos referimos a los extractos de solventes orgánicos o acuosos de plantas o hierbas con actividad antimicrobiana que reducen considerablemente la descomposición de frutas y hortalizas (Usall *et al.*, 2015). Se trata de sustancias biodegradables con actividad fungicida o fungistática directa, capaces de retrasar la senescencia y alargar la vida útil de los productos tratados sin que se modifique su calidad sensorial. Generalmente, son compuestos que produce la propia planta para protegerse contra plagas y enfermedades (Palou *et al.*, 2016).

Se constató una reducción del desarrollo *Pythium aphanidermatum* mediante la macroalga *Sargassum vulgare* (Ammar *et al.*, 2017). También un alga, concretamente de *Laminaria digitata*, se confirmó que retardaba la pudrición poscosecha causada por *Rhizopus* sp. al provocar una disminución significativa en el crecimiento del micelio y una supresión de la germinación de los esporangios (De Corato *et al.*, 2018). Anteriormente, Bautista-Baños *et al.* (2000), indicaron que con los extractos de hojas de papaya y chirimoya se había conseguido reducir la podredumbre por *Rhizopus stolonifer*. Recientemente, se han probado extractos de plantas medicinales (*Melia azedarach*, *Combretum erythrophyllum* y *Quercus acutissima*) en el control de diferentes especies de *Fusarium* sp., mostrando una fuerte actividad antifúngica (Seepe *et al.*, 2020).



#### **1.4.4. Revestimientos y películas comestibles**

Los recubrimientos comestibles son métodos fiables, saludables y ecológicos para mejorar la calidad poscosecha y alargar el periodo de almacenamiento de los productos hortofrutícolas al reducir la deshidratación, inhibir los procesos de senescencia, disminuir el daño mecánico y microbiológico y mejorar la apariencia general del producto (Arnon-Rips *et al.*, 2021). Generalmente, se utilizan biopolímeros obtenidos a partir de los residuos de la industria alimentaria o recursos subutilizados de proteínas, lípidos y polisacáridos que son biodegradables, comestibles y ejercen una función activa como compuestos antioxidantes, nutracéuticos, antimicrobianos y aromatizantes (Al-Tayyar *et al.*, 2020). Se han utilizado ampliamente biopolímeros como la pectina, alginato, almidón, quitosano, gomas y carragenano con este fin (Nair *et al.*, 2020).

El quitosano, compuesto biodegradable natural derivado del exoesqueleto de los crustáceos, es capaz de controlar numerosas enfermedades en diferentes productos hortícolas durante los periodos de pre y poscosecha (Bautista-Baños *et al.*, 2006). Su efectividad como conservante natural es ampliamente conocida, los revestimientos y películas hechos a partir de quitosano tienen excelentes propiedades mecánicas y son selectivos a la permeabilidad de gases como el O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Nair *et al.*, 2020). Se ha demostrado que la aplicación de tratamientos a base de quitosano es efectiva en el control de *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Ramos-García *et al.*, 2012). Su aplicación en brócoli mínimamente procesado permitió reducir el crecimiento microbiano y extender la vida útil del producto hasta 12 días en condiciones de almacenamiento refrigerado (Pizato *et al.*, 2020).

Destacan también los geles y extractos de *Aloe vera*, por su actividad bioactiva y antimicrobiana como agentes conservantes (Palou *et al.*, 2016).

En los últimos años, se ha incrementado el uso de recubrimientos comestibles derivados de polisacáridos, especialmente los de pectina y carboximetilcelulosa por su costo relativamente bajo y por ser buenos portadores de varios agentes bioactivos (Panahirad *et al.*, 2021). La pectina, por ejemplo, ha sido utilizada como recubrimiento comestible para mantener los parámetros de calidad del melón recién cortado (Ferrari *et al.*, 2013).

#### **1.4.5. Aditivos alimentarios: sales orgánicas e inorgánicas**

Las sales orgánicas e inorgánicas sintéticas pueden tener actividad antimicrobiana contra patógenos poscosecha, presentan una alta solubilidad en agua y se pueden utilizar como ingrediente de los revestimientos comestibles, dado su impacto en el control de los factores fisiológicos y patológicos que condicionan la vida poscosecha de los productos hortícolas frescos (Palou y Pérez-Gabo, 2021). El uso de sales en los programas de manejo de enfermedades permite reducir el número de tratamientos con fungicidas convencionales. Destacan los bicarbonatos, fosfatos, benzoatos, carbonatos, cloruros acetatos, silicatos, sorbatos, sales de parabenos, etc. (Palou, 2018).

La aplicación de fosfato de amonio mostró altos niveles de inhibición de la tasa de crecimiento de *Fusarium solani* (Ghadiri *et al.*, 2013). El cloruro de calcio redujo significativamente el desarrollo de *Rhizopus stolonifer*; este resultado se intensificó cuando se combinó con el aceite de limoncillo, lo que causó cambios en la ultraestructura de *R. stolonifer* tras el efecto sinérgico de ambos tratamientos (Salem *et al.*, 2016).

Entre las desventajas generales de los tratamientos con sal, podemos destacar los riesgos de efectos adversos sobre la calidad de los vegetales almacenados a largo plazo, el escaso valor residual para proteger el producto ante futuras infecciones posteriores, dificultades para la aprobación regulatoria de su uso y la menor eficacia y persistencia de los tratamientos en comparación con los fungicidas tradicionales (Usall *et al.*, 2008). Por otro lado, también presentan una serie de ventajas generales, tales como su bajo coste, el destacable efecto curativo que ejercen y la alta compatibilidad con otros tratamientos de control (Palou *et al.*, 2016). Sin embargo, para poder explotar el potencial uso de las sales frente al empleo convencional de fungicidas, es necesario una mayor innovación regulatoria a nivel mundial para agilizar el registro de estas sustancias como tratamientos eficaces en el control de las enfermedades (Deliopoulos *et al.*, 2010).

#### **1.4.6. Inducción de resistencia en el huésped**

Los productos vegetales utilizan una amplia gama de estrategias para defenderse de los ataques de microorganismos patógenos que incluyen: cambios en las paredes celulares, acumulación de fitoalexinas y producción de hidrolasas fúngicas (Usall *et al.*, 2016).

Podemos inducir a las frutas y hortalizas a que desarrollen una mayor resistencia a la infección por patógenos mediante elicitores químicos, físicos y biológicos, con el objetivo de controlar la descomposición poscosecha (Romanazzi *et al.*, 2016). Para poder maximizar la efectividad de los inductores de resistencia, es imprescindible conocer el mecanismo y los factores que intervienen en el efecto inductor, aunque es poco frecuente conseguir un control íntegro de la infección (Yang *et al.*, 2009). Una inducción de las respuestas de resistencia puede provocar una alteración de otros procesos en el vegetal. Este efecto normalmente queda representado por ajustes en el crecimiento y desarrollo de las plantas; ante la activación de los mecanismos de resistencia inducida, los recursos energéticos asignados para el crecimiento se priorizan para ser utilizados en la supervivencia contra una amenaza (Pétriacq *et al.*, 2018).

Recientemente, se ha estudiado el efecto del ácido acetilsalicílico en el control de la podredumbre por *Fusarium* en melón, lo que indujo actividades enzimáticas y expresiones génicas que permitieron mejorar la expresión de especies reactivas de oxígeno en el control de la enfermedad (Huali *et al.*, 2020). También en melón, la luz pulsada ultravioleta permitió controlar la enfermedad provocada por *Fusarium pallidoroseum*. Se utilizó el ácido pipecólico y la orientina como biomarcadores asociados en el control de esta enfermedad poscosecha (Filho *et al.*, 2020). La aplicación del compuesto natural osthol indujo una respuesta defensiva en hojas de calabaza, lo que provocó la acumulación de quitinasa y peroxidasa y la potenciación de la actividad fenilalanina amonio liasa (Shi *et al.*, 2007). Se aplicó radiación UV-C y UV-B para generar un estrés abiótico en brócoli, consiguiendo inducir los mecanismos de protección, además de mejorar la calidad y el contenido de fitocompuestos como los glucosinolatos durante su almacenamiento (Duarte-Sierra *et al.*, 2019, 2020).

Hoy en día, la inducción de defensas en el huésped tiene un papel central en las estrategias de manejo de enfermedades, fundamentalmente porque no provoca la aparición de aislamientos resistentes a patógenos, es de amplio espectro, sus efectos son duraderos, reduce el uso de fungicidas y favorece el aumento de compuestos antioxidantes beneficiosos (Romanazzi *et al.*, 2016).

En cualquier caso, el éxito de cualquier tratamiento poscosecha que se aplique, estará condicionado por la exactitud y precisión identificativa del patógeno causante del daño.

## CAPÍTULO 2

---

### Objetivos

Esta tesis doctoral basa su estudio en la identificación y caracterización de enfermedades producidas por diferentes especies fitopatógenas de los géneros *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizopus* en brócoli, melón y calabaza respectivamente, sobre las que no se tenían referencias en España, y en algunos casos, tampoco a nivel mundial. El **objetivo principal** es contribuir al conocimiento de enfermedades inusuales o frecuentemente mal catalogadas durante la producción agrícola, como base para aplicar un control fitosanitario eficaz contra estas enfermedades.

La consecución procedimental del objetivo principal se ha alcanzado a través de los siguientes **objetivos específicos**:

1. Descripción de la sintomatología y aislamiento del agente causal de los síntomas, evaluando las posibles interacciones microbianas que se producen en la evolución de los síntomas.
2. Estudio de las características fenotípicas de los organismos causales de la enfermedad, así como de la microbiota acompañante.
3. Confirmación de la identidad del aislado mediante técnicas moleculares basadas en el análisis de diferentes secuencias génicas, que permitan su correcto encuadre a nivel de especie.
4. Estudio etiológico de la asociación organismo aislado-planta por medio de la inoculación artificial de los microorganismos en vegetales sanos para la verificación de los postulados de Koch.



## CHAPTER 2

---

### Objectives

This doctoral thesis is based on the study of identification and characterization of diseases caused by different fungal pathogen species of *Pythium*, *Fusarium* and *Rhizopus* affecting broccoli, melon and pumpkin, respectively. There was to date no reference to these diseases in Spain, and little to no reference almost all over the world. The **main aim** of this work is to contribute to the knowledge of uncommon or little-known diseases during vegetable production as a starting point for reaching an effective control of these diseases by means of suitable treatments.

In order to attain this goal, the following objectives were applied:

1. Description of symptomatology, and isolation of the causal agent from affected tissues, evaluating microbial interactions taking place in the evolution of the symptoms.
2. Study of phenotypic features of microorganisms causing diseases as well as their associated microbiota.
3. Identity confirmation of the isolated agent using molecular techniques based on the analysis of different genic sequences, which allow for the right identification at species level.
4. Etiological study of the isolated organism-plant association via artificial inoculation of microorganisms in healthy plants in order to verify Koch's postulates.



## CAPÍTULO 3

---

### Materiales y métodos generales

#### 3.1. Descripción de la sintomatología

El proceso de diagnóstico de enfermedades de las plantas se inicia con un examen de la muestra y, a ser posible, del proceso evolutivo de la sintomatología. La calidad de la misma y los detalles del historial previo que hay que averiguar, son aspectos muy importantes cuando nos enfrentamos a la identificación de una nueva patología. El patógeno puede estar ausente en muestras con un avanzado estado de descomposición, puede estar presente sin signos detectados o estar oculto por saprófitos u otros organismos secundarios u oportunistas. Una muestra apropiada debe de constar de varios especímenes diferentes, entre los que se incluyan las distintas etapas de desarrollo de la enfermedad y por supuesto, un espécimen sano, que sirva como control negativo si fuese necesario. La falta de información acerca de la evolución de la sintomatología puede dificultar un diagnóstico real. Algunos de los factores iniciales que se valoran son: la distribución del problema dentro de la plantación o en el lugar de almacenaje, momento en el que tuvo lugar su aparición, condiciones edafoclimáticas que se daban en ese momento, el tipo de variedad que puede ser un indicativo del nivel de susceptibilidad a una enfermedad en concreto, etc. El personal que diagnostique la muestra puede valerse del examen visual de signos y síntomas que presente la misma, anotando las variaciones características del órgano vegetal afectado. Este paso inicial se complementa con la ayuda del instrumental del que disponga el técnico, pudiendo llegar a hacer una primera valoración del patógeno que está involucrado; ya sea hongo, bacteria, virus, nematodo u otro agente. Frecuentemente, el patógeno no muestra una evidencia física clara o existe una ambigüedad en cuanto al factor u organismo que ha causado dichos síntomas; en estas situaciones, es preciso recurrir a un examen más



profundo o a realizar pruebas de diagnóstico (Putnam, 1995). Para el desarrollo de estas pruebas es fundamental mantener unas correctas condiciones asépticas del material que se somete a estudio.

De acuerdo con el orden que se tiene que llevar a cabo para aplicar los diferentes métodos de diagnóstico, Fox (1993) sugiere, para enfermedades fúngicas, comenzar con una inspección visual, realizar un examen microscópico, identificar los cultivos puros a partir del posible aislamiento del patógeno y, por último, recurrir a métodos moleculares para respaldar los resultados a los que se haya llegado con la caracterización morfológica. El orden de ejecución de estos métodos puede modificarse de unos patógenos a otros, pero siempre se progresa desde los métodos simples que no sean excluyentes a los métodos más complejos y específicos. Por supuesto, dependiendo de la importancia de la muestra, el nivel de identificación que se persiga va a variar, cuando se habla de interacciones no documentadas o inusuales; ese interés es máximo.

En nuestro caso, el proceso básico desarrollado para aislar al presunto patógeno de un tejido con síntomas, pero carente de signos, fue el siguiente:

1. Lavado con agua de abastecimiento para suprimir la mayor parte de la comunidad microbiana existente en la superficie del tejido vegetal estudiado. Este es el primer proceso de higienización.
2. Desinfección de la zona afectada con NaOCl (1%) durante 5 min. Transcurrido este tiempo, la desinfección se completa aplicando etanol reactivo 96% por pulverización.
3. Enjuagado del tejido con agua destilada estéril con el fin de eliminar los residuos de desinfectantes.
4. Siembra aséptica de un fragmento de tejido del borde de las lesiones o síntomas en medio de cultivo sintético.

Este procedimiento desglosado busca separar al organismo que presuntamente está causando los síntomas observados; protocolo basado en el concepto de que el organismo causal de la enfermedad debe estar generalmente presente en el interior del tejido vegetal, especialmente en la zona próxima a los síntomas.

Salvo excepciones, se trabajó inicialmente con dos medios de cultivo sintéticos para

llevar a cabo los aislamientos: agar de patata y dextrosa (PDA) y agar de recuento total (PCA), ambos de Scharlab<sup>®</sup>, Barcelona, España. Estos medios garantizan el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos. Es importante no introducir inicialmente medios selectivos que impidan el desarrollo del agente causal.

A menudo, se recurrió a materiales de referencia que disponen de fotografías o ilustraciones como ayuda para llegar a un diagnóstico preliminar. Este tipo de recursos proporcionan información muy útil. En ellos se suele incluir un índice de hospedadores junto a un listado de los patógenos que se han encontrado asociados (Riley *et al.*, 2002).

## **3.2. Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica**

### **3.2.1. Caracterización de bacterias**

Las pruebas fenotípicas aplicadas a los aislados bacterianos se seleccionaron estratégicamente para detectar actividad pectinolítica. Para ello se llevó a cabo la prueba de la patata. Para intentar dilucidar si los aislados pectinolíticos era afines taxonómicamente a *Pectobacterium* sp. o a *Pseudomonas* sp., se realizaron las pruebas metabolismo O/F de la glucosa. Por último, para afinar más en la taxonomía de las posibles *Pseudomonas* pectinolíticas obtenidas, se detectó la presencia de pigmentos pioverdinas.

Para la realización de la prueba pectinolítica de la patata, se aplicó el siguiente protocolo (Andrés-Yeves *et al.*, 1991):

1. Introducir en una placa de Petri estéril unos recortes de papel de filtro cubriendo el fondo.
2. Humedecer el papel de filtro hasta su saturación con el fin de crear una cámara húmeda.
3. Lavar con abundante agua de abastecimiento una patata pequeña. Secarla con papel secante o de filtro y pasarle un algodón con alcohol o pulverizar directamente el alcohol sobre su superficie. Utilizar guantes que se mantienen siempre limpios pulverizándolos con alcohol con cierta frecuencia.
4. Partir una rodaja de patata con un bisturí flameado y depositarla con pinzas encima del papel humedecido.

5. Tomar un inóculo de la bacteria problema con el asa de siembra flameada y situarlo en el centro de la rodaja de patata.
6. Hacer un ligero corte en la superficie de la patata con el bisturí justo encima del inóculo bacteriano.
7. Cerrar la placa y sellarla con Parafilm para evitar la deshidratación.
8. Incubar a 25 °C durante un período máximo de 48 horas. La prueba es positiva si se produce podredumbre blanda bacteriana en menos de 48 horas (erwinias pectinolíticas). Más de 48 horas pueden ser las mismas y/o pseudomonas fluorescentes.

El procedimiento desarrollado para estudiar el tipo de metabolismo de la glucosa se describe a continuación (Andrés-Yeves *et al.*, 1991):

1. Utilizar dos tubos conteniendo el medio de cultivo O/F por especie bacteriana.
2. Sembrar por picadura en los dos tubos.
3. Tapar uno de los tubos manteniéndolo erguido (tubo O: aeróbico), en el otro agregar entre 5 y 10 mL de agar de sellado anaeróbico con el fin de provocar condiciones anaeróbicas (tubo F: fermentativo).
4. Incubar a la temperatura adecuada durante 2 o 3 días.

Los resultados obtenidos se interpretaron de acuerdo con las siguientes apreciaciones:

1. El tubo da positivo si el color del medio cambia a amarillo, y negativo cuando permanece de color inicial (verde) o cambia a azul.
2. El colorante azul de bromotimol tiene el siguiente rango de color, dependiendo del pH: amarillo - 6,0 - verde - 7,6 - azul.
3. Para la interpretación de los resultados se deben de tener en cuenta las siguientes consideraciones:
  - O (+), F (+): Degradación fermentativa. Anaerobio facultativo.
  - O (+), F (-): Degradación oxidativa. Aerobio.
  - O (-), F (+): Degradación fermentativa. Anaerobio estricto.
  - O (-), F (-): No degrada el azúcar utilizado (en este caso glucosa).

Por último, las pioverdinas se detectaron aplicando el siguiente protocolo (Andrés-Yeves *et al.*, 1991):

1. Sembrar la aislado de *Pseudomonas* problema en agar B de King haciendo estrías paralelas.
2. Incubar a 25 °C durante 24 o máximo de 48 horas.
3. Colocar la placa bajo una fuente de luz ultravioleta de longitud de onda comprendida entre 256 y 366 nm. Observar la emisión de fluorescencia con la debida protección de los ojos. Si la bacteria emite luz fluorescente, la especie problema pertenece al grupo de las pseudomonas fluorescentes. El pigmento difunde en el agar, por lo que el medio de cultivo se verá también tenuemente fluorescente.

### **3.2.2. Caracterización de hongos filamentosos**

Tradicionalmente, para identificar y caracterizar los hongos filamentosos se han utilizado métodos morfológicos. Estos métodos se basan en una observación detallada tanto a nivel microscópico como macroscópico de las colonias (morfología, color, textura, exudado, pigmento difusible, tipo de crecimiento, etc.). Los datos de morfología microscópica de los cultivos son los que proporcionan la información más importante para la identificación y el control de la autenticidad de los cultivos. Se debe de tener en cuenta que en los hongos existen dos tipos de reproducción (asexual y sexual), se pueden observar cuerpos fructíferos particulares del estado asexual, o bien, estructuras características del estado sexual (St-Germain y Summerbell, 1996). Es bastante frecuente que en un mismo cultivo se den estructuras propias de los dos tipos de reproducción. Puede ocurrir que para el desarrollo de determinadas estructuras características de un aislado fúngico en concreto, se requiera del uso de medios de cultivo selectivos, diferenciales o que contenga componentes específicos que permitan el desarrollo de las estructuras de interés a nivel morfológico. En cualquier caso, a lo largo de los capítulos de este trabajo se irán especificando los medios de los que se hace uso para tal fin.

Una correcta caracterización morfológica, se completa con la determinación de las variables asociadas a la evolución fúngica en medio de cultivo sintético. Se detallan a continuación las más destacadas:

• **Área de desarrollo de la colonia (cm<sup>2</sup>)**

Representa la medida diaria del área de la misma colonia. Generalmente se toma el diámetro de la colonia principal que parte del punto de inoculación. Los resultados se obtuvieron con el software ImageTool for Windows, versión 3.0, a partir de las fotografías digitales tomadas diariamente, tras calibrar el diámetro de la placa Petri, como medida de referencia conocida.

• **Tasa de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día)**

Es la velocidad de crecimiento de un hongo medido en su fase lineal de crecimiento cuando se desarrolla en medio de cultivo sólido. La fase lineal de crecimiento es la fase en la que el hongo crece a pleno rendimiento, una vez ha pasado la fase exponencial que suele durar solamente unas pocas horas, y finaliza en el momento de entrar en la fase estacionaria, donde la velocidad de crecimiento disminuye o se hace constante. Esta variable se determinó mediante la pendiente de la recta (fase lineal) obtenida cuando se representa en unos ejes cartesianos el tiempo y el área o diámetro de la colonia, obviando las fases de crecimiento que no corresponden a la fase lineal. También se obtiene aplicando la siguiente ecuación:

$$\mu \text{ (cm}^2\text{/día)} = \frac{A_{(t+1)} - A_t}{(t + 1) - t}$$

donde,

$\mu$ : Tasa de crecimiento (cm<sup>2</sup>/día),

$A_{(t+1)}$ : Área de la colonia un día determinado (cm<sup>2</sup>),

$A_t$ : Área de la colonia el día anterior o días anteriores considerados a  $t + 1$  (cm<sup>2</sup>),

$t + 1$ : Un día determinado (días) y,

$t$ : El día anterior considerado a  $t + 1$  (días)

• **Duración de la fase lineal (días)**

Son los días que transcurren entre el final de la fase exponencial (generalmente se considera la fase de latencia, porque la fase exponencial suele pasar desapercibida, debido a que dura muy pocas horas) y el inicio de la fase estacionaria o de deceleración.

Este valor se obtiene a partir de los gráficos de tiempo-área, la zona lineal se puede detectar visualmente en el gráfico.

#### • **Duración de la fase latencia (horas)**

Es el periodo de tiempo requerido por el hongo para adaptarse al medio en el que ha sido sembrado e iniciar su crecimiento. Esta fase representa el período de adaptación a la nueva situación si el propágulo es un fragmento de hifa o espora fúngica. En este último caso, también representa el tiempo transcurrido desde que la espora detecta condiciones de germinación, emite el tubo germinativo que posteriormente crece y se ramifica.

Este período lo establecimos desde el momento de siembra hasta que observamos el crecimiento del hongo.

El tratamiento de los resultados se realizó para cada variable a través del cálculo de la media aritmética de las repeticiones para cada tratamiento, como la estimación del valor medido y la medida del error, o desviación estándar, como la estimación de la precisión. Conociendo el número de repeticiones por tratamiento, el valor medio de la variable y su desviación estándar, el lector puede crear los intervalos de confianza del valor de media para analizar la separación de medias entre tratamientos (Miller y Miller, 1993). Los resultados se presentaron a través de gráficos cartesianos del valor de la variable en función del tiempo. Se crea entonces un conjunto de medidas repetidas a intervalos diarios que se desarrollan sobre las mismas unidades experimentales (placa de cultivo).

A nivel de laboratorio, para llevar a cabo la caracterización morfológica de los aislados sometidos a estudio se utilizó el microscopio óptico Olympus modelo BX50F a 10 x 40 y el microscopio de contraste de fases Olympus modelo BX41TF. Las imágenes fueron tomadas con la cámara Olympus SC20.

### **3.3. Caracterización genética molecular**

Los métodos basados en caracterizaciones moleculares (ADN y ARN), proporcionan una herramienta esencial para el diagnóstico preciso de las enfermedades de las plantas,

además de la exploración visual tradicional que se haga de los síntomas (Martinelli *et al.*, 2015).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática guiada por cebadores, capaz de amplificar de forma exponencial el ADN y ARN. Presenta un enfoque altamente viable como alternativa para la detección y diagnóstico de patógenos, como consecuencia, presenta grandes ventajas frente a los métodos tradicionales de identificación. Los ensayos de detección basados en la PCR son relativamente económicos, eficientes, sensibles, rápidos, específicos y versátiles. Se han hecho multitud de trabajos basados en PCR que involucran a una gran cantidad de patógenos de plantas y que confieren una gran valía a este método de detección (López *et al.*, 2009; Balodi *et al.*, 2017).

### **3.3.1. Identificación de bacterias**

Los aislados bacterianos fueron identificados mediante la secuenciación del ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S). Para ello, se utilizó el kit E.Z.N.A. Bacterial DNA (Omega Bio-tek) y el protocolo empleado fue el de centrifugación. Se cogió cada colonia bacteriana con un émbolo esterilizado y se depositó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL con 500 µL de agua libre de nucleasa (Introgen) estéril. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 4.000 g. Realizado esto, se siguieron las instrucciones del protocolo del kit de extracción. El ADN fue eluido en agua libre de nucleasa estéril y se midió su concentración en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El ADN fue guardado a -20 °C hasta su uso.

El volumen total de la amplificación PCR (Reacción de la Polimerasa en Cadena) fue de 25 µL. Utilizándose 2 µL de ADN (100 ng/µL), 0,25 µL de Biotaq™ ADN polimerasa 5 U/µL (Bioline) y 2,5 µL de cada primer (10 µM).

Los “primers” empleados para la amplificación del gen ADNr 16S fueron los descritos por Weisburg *et al.* (1991); rD1: 5´ AAGGAGGTGATCCAGCC (reverso) y fD1: 5´ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (directo).

Las condiciones térmicas de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 5 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos (1 min 95 °C, 1 min 60 °C y 1.30 min 72 °C) y una extensión final durante 7 min a 72 °C (MyCycler thermal cycler, BioRad).

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa (1,5% / TBE 1X) tras 10 min en una tinción con bromuro de etidio.

La banda de ADN obtenida (~1.500 pb) se purificó de acuerdo con las instrucciones del kit Pure Link Quick Gel Extraction and PCR Combo kit DNA (Introgen).

Una de las principales ventajas que tiene la secuenciación parcial del gen ARNr 16S es que los datos de otras secuencias categorizadas están fácilmente disponibles en bases de datos científicas, los resultados obtenidos pueden ser reproducibles y el análisis de los datos es escalable, lo que permite hacer una comparativa con secuencias de estudios independientes.

Frecuentemente, se ha utilizado el gen ARNr 16S para el análisis de evolución de las secuencias porque presenta una función estable, su distribución es universal, la longitud es apropiada y tiene una tasa de evolución lenta (Madigan *et al.*, 2009). Al ser un gen que presenta una tasa de evolución lenta, dificulta, en muchas ocasiones, el que se establezcan relaciones filogenéticas cuando hay una reciente divergencia entre taxones. Este hecho justifica su uso como marcador para rangos taxonómicos superiores al de especie, evitándose encuadres erróneos (Stackebrandt y Goebel 1994).

#### **3.3.2. Identificación de hongos filamentosos**

En eucariotas, al igual que en procariotas, se recurre al uso de métodos moleculares al ser considerados una herramienta de gran utilidad en la identificación de especies. Esta práctica cobra especial importancia cuando la diferenciación a través de los rasgos macroscópicos no es concluyente, o bien el aislado comparte multitud de características bioquímicas o fisiológicas con varias especies.

Para confirmar la identidad molecular de los aislados fúngicos los análisis se realizaron, al menos, a través de la región ITS1 - 5,8S - ITS2 o de la región D1/D2 del gen 28S y en un caso, del gen TEF1- $\alpha$  ("transcription elongation factor").

##### **3.3.2.1. Región ITS1 - 5,8S - ITS2**

Para las secuencias de ADN del espaciador transcrito interno 1 (ITS1) y 2 (ITS2) del ADN ribosomal (ADNr), entre las que se incluye el gen ARNr 5,8S, el ADN se extrajo siguiendo un protocolo modificado descrito por Ceniz (1992). Este protocolo utiliza el tampón



Raeder y Broda (1985), siendo eluido en agua libre de nucleasa estéril (Introgen) y medida su concentración en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El ADN se conservó a -20 °C hasta su uso.

Los ensayos de PCR se llevaron a cabo utilizando 2,0 µL de ADN molde (50 ng/µL), 0,3 µL de ADN polimerasa Horse Power Taq 5 U/µL (Canvas Biotech, España) y 1,2 µL de cada cebador (10 µM), en un volumen final de reacción de 20 µL. Los cebadores de PCR empleados para amplificar los espacios de transcripción interna del ADN ribosomal (ADNr) fueron: ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), (White *et al.*, 1990). Las condiciones térmicas de la PCR fueron: desnaturalización inicial 5 min a 95 °C, seguido de 30 s a 95 °C, 1 min a 56 °C, 30 s a 72 °C durante 35 ciclos. Finalmente, una etapa de extensión durante 7 min a 72 °C (MiCycler thermal cycler, BioRad). Los productos PCR fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa 1,5% / TBE 1X con 10 µL de bromuro de etidio (1/10). La banda de ADN obtenida (~450 pb) fue purificada siguiendo las instrucciones del kit Pure Link Quick Gel Extraction and PCR Combo kit DNA (Introgen).

### **3.3.2.2. Región D1/D2 del gen 28S y gen TEF1-α (“transcription elongation factor”)**

La amplificación y posterior secuenciación (con lecturas en las dos direcciones) de los dominios D1/D2 del extremo 5' del gen que codifica el ARNr 28S se realizó utilizando los cebadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (O'Donnell, 1993; Kurtzman y Robnett, 1998).

Para el gen TEF1-α (“transcription elongation factor”), se utilizaron los cebadores ef1 (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) (O'Donnell *et al.*, 2010) y ef2 (GGARGTACCAGTSATCATGTT) (O'Donnell *et al.*, 1998).

El ADN genómico total del micelio fresco se extrajo usando el Kit de preparación de ADN de Animales y Hongos (Jena Bioscience). La calidad del ADN extraído se verificó con un espectrofotómetro NanoDrop\_ND-1000 utilizando el software ND-1000 v. 3.3.0 (Coleman Technologies, Wilmington, DE, USA).

Las plantillas de ADN se amplificaron por PCR en el termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems). Las amplificaciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 µL que contenía 1 µL (50 pmol/µL) de cada uno de los cebadores universales, 0,25 µL (5 U/µL)

de ADN polimerasa Taq (Takara, Clontech Laboratories, Inc.), 5  $\mu$ L de tampón de reacción 10X, 2,5  $\mu$ L de DMSO, 4  $\mu$ L de mezcla de dNTP (10 mM), 31,25  $\mu$ L de agua filtrada estéril (sistema de purificación Mili-Q, Millipore, Billerica, MA, USA) y 5  $\mu$ L de muestra de ADN (150-200 ng de ADN genómico).

Las condiciones de PCR para la región de LSU D1/D2 se establecieron de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 52 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 1 min y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los controles negativos, desprovistos de ADN, se incluyeron simultáneamente en el proceso de amplificación.

El programa de PCR para la amplificación de TEF1- $\alpha$  consistió en un ciclo de 5 min a 94 °C, diez ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 55 °C, y 1.5 min a 72 °C, 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 52 °C, y 1.30 min a 72 °C junto a un paso de elongación posterior de 6 min a 72 °C.

Los productos amplificados se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con Safeview Nucleic Stain (NBS Biologicals) y se purificaron mediante el Kit UltraClean PCR Clean-Up (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA).

La secuenciación se llevó a cabo mediante los reactivos ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready y el secuenciador ABI3730XL (Applied Biosystems). Los cebadores de secuenciación fueron los mismos que se usaron en la reacción de amplificación.

Las secuencias se generaron bidireccionalmente y las alineaciones posteriores se corrigieron manualmente para detectar artefactos de secuenciación, cuando fuera necesario, con el software de secuenciación de ADN Chromas versión 2.6.6.

Para el análisis de cualquiera de las secuencias genéticas estudiadas, se empleó el software MEGA versión X (MEGA, 2018), a continuación, dichas secuencias se vincularon con la página web “The Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) del “National Center for Biotechnology” (NCBI, 2021). BLAST permite alinear y comparar las secuencias de nucleótidos que se introduzca de entrada, con secuencias que ya están categorizadas, siendo un recurso muy importante para la búsqueda y alineación de secuencias (Boratyn *et al.*, 2013).

Las secuencias ribosómicas más utilizadas para diferenciar a nivel de especie son en las que está incluida el gen 5,8S y las regiones intergénicas contiguas ITS1 e ITS2 y la región D1/D2 del gen 28S. Las regiones ITS1 e ITS2 se emplean en el análisis de especies próximas. Al no codificar ningún gen se caracterizan por ser más variables, mientras que la región ARNr 28S, al tener una tasa de evolución más alta para determinadas regiones concretas de mayor variabilidad, sí que permite establecer diferencias a nivel de especie. Existe una gran disponibilidad de secuencias de estas regiones en las bases de datos, permitiendo que esta metodología sea válida para asignar un aislado fúngico a una especie en concreto, especialmente cuando el porcentaje de homología de las secuencias es del 99% o superior (Kurtzman, 2014).

La extracción y amplificación molecular de procariontas y de la región ITS1 - 5,8S - ITS2 de eucariotas se hizo en el laboratorio de Resistencia a Insecticidas, en el Instituto de Biología Vegetal (IBV) de la Universidad Politécnica de Cartagena, mientras que la secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación de ADN y Diagnóstico Genético (Secugen, 2021) de Madrid. La región D1/D2 del gen 28S y del gen TEF1- $\alpha$  de eucariotas, se amplificaron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y secuenciaron en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

### **3.4. Caracterización filogenética**

Para poder efectuar una estimación en las relaciones entre los taxones o secuencias y sus teóricos ancestros comunes se recurre a la creación de árboles filogenéticos. El objetivo fundamental de estas creaciones es estimar las relaciones que existen entre las especies representadas a través de sus secuencias (Hall, 2013).

Se realizó, para todos los aislados fúngicos sometidos a estudio (Tabla 3.1), un análisis molecular evolutivo utilizando el software MEGA versión X (Kumar *et al.*, 2018). Esta herramienta bioinformática permite hacer un buen análisis del genoma de secuencias moleculares y medir la distancia evolutiva en la elaboración de filogenias (Khan, 2017). Se llevaron a cabo alineamientos de secuencia múltiples con CRUSTAL W. El análisis filogenético posibilita identificar el número de cambios que se han podido producir

respecto al ancestro común, la alineación de secuencias múltiples constituye un paso prioritario en la detección de estos cambios (Roy *et al.*, 2014). El programa BLAST se empleó para buscar secuencias homólogas a las secuencias estudiadas desde la base de datos del NCBI. Los números de acceso de las secuencias utilizadas para el análisis filogenético se descargaron del GenBank, las secuencias se alinearon y editaron manualmente. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de unión de vecinos (Saitou y Nei, 1987). El porcentaje de réplicas de los árboles en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (2.000 réplicas) se muestran junto a las ramas (Felsenstein, 1985). La prueba de arranque nos permite medir la consistencia interna del conjunto de datos moleculares, examinando si las alineaciones que han sido ligeramente modificadas admiten los mismos racimos (Russo y Selvatti, 2018). Los árboles están dibujados a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima probabilidad compuesta (Tamura *et al.*, 2004) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Las posiciones de codón incluidas fueron 1<sup>a</sup> + 2<sup>a</sup> + 3<sup>a</sup> + Sin codificación. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Se emplearon diferentes grupos externos que fueron seleccionados en base al criterio de señal filogenética para el grupo interno, cuando se considera que los estados de los taxones externos del candidato son plesiomórficos en lo relacionado con el grupo interno, con el objetivo de medir el contenido de plesiomorfia con el taxón externo (Lyons-Weiler *et al.*, 1998).

**Tabla 3.1.** Datos de las secuencias de ADN identificadas en esta tesis.

Especies de hongos	Aislado	Cultivo	Accesión al Genbank		
			ITS	LSU	TEF1- $\alpha$
<i>Pythium ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	BRSA-02	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	MZ305019	-	-
<i>Fusarium solani</i>	MLFR-01	<i>Cucumis melo</i> var. <i>reticulatus</i>	MZ353016	-	-
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	MLFR-03	<i>Cucumis melo</i> var. <i>reticulatus</i>	MZ353606	-	-
<i>Fusarium equiseti</i>	MLFR-07	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	MZ354629	-	-
<i>Fusarium annulatum</i>	MLFR-09	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i>	MZ355136	-	OL960473
<i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>sexualis</i>	CLBPZ-13	<i>Cucurbita moschata</i>	-	MZ666904	-

### 3.5. Métodos de conservación de microorganismos

Durante el desarrollo de esta tesis, creamos la colección de microorganismos MAPYS (Microorganismos de la Agricultura, Poscosecha y Sostenibilidad), con sede en la Escuela

Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de Cartagena (ETSIA-UPCT), asociada a la Red Española de Microorganismos (REDESMI) y gestionada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de Valencia. La creación de esta colección obedece a la importancia de almacenar los microorganismos fitopatógenos y antagonistas detectados fundamentalmente en la Región de Murcia y se fundamenta en el interés prioritario de REDESMI que es la conservación, explotación y valorización de los recursos microbianos españoles, fundamentalmente aquellos que son de importancia para la agricultura y la alimentación. Las cepas microbianas que a lo largo esta tesis se han manejado, se mantienen almacenadas de acuerdo con los métodos conservación recomendados todos por la CECT.

### **3.5.1. Conservación por resiembra periódica**

En este método de conservación los organismos se mantienen activos a lo largo de todo el proceso. Se basa en la siembra del microorganismo en un medio de cultivo, temperatura de incubación y almacenamiento bajo condiciones que aseguren su control y adecuación. El proceso se repite a intervalos de tiempo que garanticen el obtener un cultivo fresco antes de perder la viabilidad del cultivo precedente.

Para cualquier laboratorio, el método de conservación por subcultivo es el más simple y asequible de todos. Aunque en su diseño se busque la seguridad, fiabilidad y utilidad en la conservación de una gran cantidad de microorganismos, bien es cierto que la estabilidad y viabilidad de los cultivos es relativamente pobre si se compara con la conservación por congelación.

El objetivo de este método es mantener cultivos estables, activos e inminentemente recuperables, evitando el envejecimiento del cultivo que se conserva, así como posibles cambios fenotípicos y genotípicos.

Su efectividad radica en la elaboración de un diseño específico para cada microorganismo, en el que se considere el medio de cultivo apropiado de acuerdo con su propio hábitat de desarrollo, el tiempo, la temperatura y las condiciones de incubación, y el periodo entre dos resiembras.

En la práctica, se trabaja intentando alargar al máximo el intervalo entre resiembras con el objetivo de prevenir cambios en las características fisiológicas y morfológicas de los

microorganismos. Este intervalo se puede prologar reduciendo la actividad metabólica del microorganismo desde varias vías:

- Disminuyendo la temperatura de almacenamiento.
- Limitando la accesibilidad de aire en el cultivo.
- Usando medios con limitación de nutrientes, no enriquecidos.

#### **3.5.2. Conservación en agua destilada estéril**

Determinadas cepas microbianas no resisten algunos tratamientos de conservación específicos. La conservación en agua destilada estéril representa un método de almacenamiento alternativo al que se puede recurrir cuando no se pueden utilizar algunos métodos como el de congelación. También se utiliza cuando queremos tener células que se puedan recuperar fácilmente, durante periodos no excesivamente prolongados en el tiempo (1 año).

Se basa en suspender en agua estéril las células del cultivo que se quieren conservar, aparentemente el agua suprime cambios morfológicos en la mayoría de los hongos (Nakasone *et al.*, 2004). Es un método fácil y económico que se ha usado frecuentemente en hongos filamentosos y levaduras. Las células en este estado no están completamente inactivas, su nivel metabólico es muy bajo, están en reposo. Es un método apropiado para la conservación a corto plazo (2-5 años) y debe de complementarse con métodos a largo plazo de almacenamiento (Smith y Onions, 1994).

Este método fue descrito originalmente por Castellani (1939). Con este procedimiento Boesewinkel (1976) almacenó una colección de 650 hongos fitopatógenos de plantas de diferentes divisiones (Ascomycota, Basidiomycota, Oomycota y hongos imperfectos), obteniendo un gran éxito en su conservación. Burdsall y Dorworth (1994) conservó 155 basidiomicetos durante 7 años, sin que se viesen afectadas la viabilidad, tasa de crecimiento y estabilidad genética de los aislados almacenados durante 7 años; la viabilidad disminuyó después de 5-10 años de almacenamiento. Dentro de los oomicetos destacan importantes géneros fitopatógenos como *Phytophthora* y *Pythium*, para los que este tipo de conservación es muy interesante porque la viabilidad se mantiene durante más de 5 años.

El procedimiento que se sigue a partir del cultivo de un hongo filamentoso en medio sólido que esté en la fase tardía de crecimiento o principio de la fase estacionaria (1-2 semanas) es el siguiente:

- Con la ayuda de un bisturí cortar 4-5 fragmentos de agar con crecimiento de micelio vegetativo del hongo de un tamaño aproximado de 0,5 x 0,5 cm.
- Introducir estos fragmentos en microtubos de 2 mL con 1,5 mL de agua destilada estéril que tengan tapón de rosca con un cierre hermético.
- Almacenar en oscuridad a una temperatura controlada entre 5-10 °C.

### **3.5.3. Conservación por congelación**

Con la conservación por congelación conseguimos paralizar el metabolismo celular al reducir el agua disponible y ralentizar las actividades enzimáticas como consecuencia de las bajas temperaturas. Es considerado un método de primera elección para la conservación a largo plazo, aunque esto no garantiza una eficacia del 100%, porque durante la congelación tienen lugar cambios tanto en el interior como en exterior celular que pueden causar daños a nivel celular.

Es conveniente que las células del material que se utilice para la conservación estén bien desarrolladas (fase tardía de crecimiento o inicio de la fase estacionaria), igual que para la conservación en agua destilada estéril. Por comodidad, se utiliza preferiblemente un medio de cultivo sólido. Cuanta más concentración celular tengamos en las suspensiones previstas a ser almacenadas, más probabilidad de supervivencia obtendremos de todo el conjunto (Smith y Ryan, 2012).

Se tendrán en cuenta también el uso de un agente crioprotector y la velocidad de enfriamiento o de descongelación.

#### **3.5.3.1. Uso de un agente crioprotector**

En nuestro caso, utilizamos como crioprotector el glicerol para reducir los daños que se producen durante la congelación. El glicerol es uno de los crioprotectores más comúnmente utilizados y dada su permeabilidad, actúa fundamentalmente a nivel intracelular. Al ser altamente hidrofílico es capaz de formar puentes de hidrógeno dando estabilidad a las macromoléculas al ocupar las zonas de agua no disponible. En este

sentido, la deshidratación intracelular se ve limitada y se previene la formación de grandes cristales de hielo (Hubálek, 2003).

La concentración a la que se aplique depende de la temperatura de almacenamiento, a menor temperatura la concentración final del crioprotector será menor. Al trabajar con un congelador convencional (-20 °C), utilizamos una concentración que oscila entre 35-40% del crioprotector. También se tiene en cuenta que a mayor tamaño celular se requiere de un porcentaje más bajo del crioprotector.

### **3.5.3.2. Velocidad de enfriamiento y de descongelación**

Se consideran momentos críticos el paso de la temperatura de trabajo a la de conservación y su reverso, porque dependiendo de cómo se lleven a cabo estas transiciones se podrá dañar o no el material biológico. De acuerdo con Heylen *et al.* (2012), el mayor daño se produce en un rango de temperatura comprendido entre -15 y -60 °C.

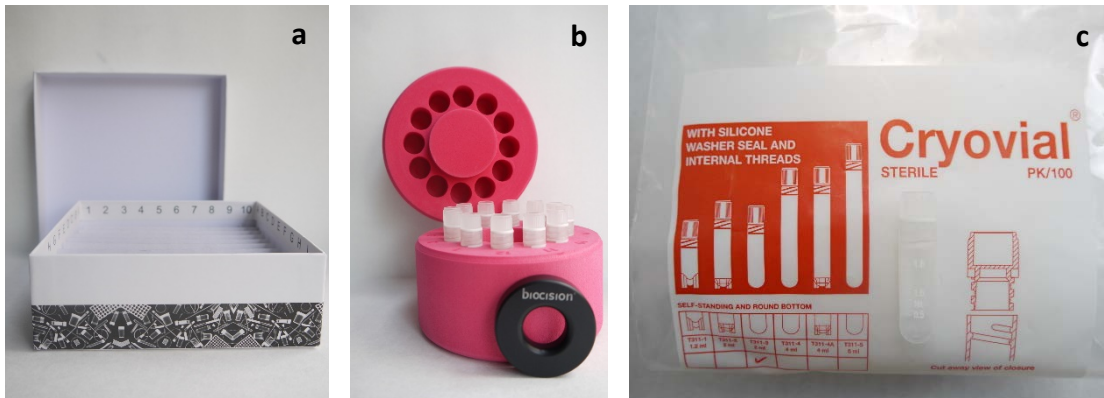
Smith y Ryan (2012) recomendaron enfriar a una tasa de -1 °C por minuto. Para conseguir trabajar en este rango disponemos de los contenedores Coolcell de Corning® (Figura 3.1b). También se presta atención al momento de la descongelación; los viales se colocan en una bandeja que esté a la temperatura de incubación del microorganismo. Las células se pueden exponer a daños por recristalización si la descongelación es muy lenta.

A modo de resumen, el procedimiento que se sigue a partir del cultivo de un hongo filamentoso en medio sólido es el siguiente:

- Utilizar el medio de cultivo y la temperatura más adecuada para conseguir un óptimo crecimiento del microorganismo en placa.
- Con la ayuda de un bisturí cortar 4-5 fragmentos de agar con crecimiento de micelio vegetativo del hongo de un tamaño aproximado de 0,5 x 0,5 cm.
- Introducir estos fragmentos en crioviales de 2 mL que contengan una suspensión en agua estéril con un 30% de glicerol. Estos crioviales estarán provistos de un tapón de rosca que asegure un cierre hermético (Figura 3.1c).
- Meter los crioviales en la nevera (5 °C), durante no menos de 30 min.



- Colocar los crioviales en el contenedor Coolcell e introducir en el congelador en el que se vaya a desarrollar la congelación durante al menos 3 horas.
- Trasladar los crioviales a las cajas de almacenaje evitando no romper la cadena de frío (Figura 3.1a).



**Figura 3.1.** Material utilizado en la colección de microorganismos MAPYS para la conservación de bacterias y hongos filamentosos por congelación. (a) caja de almacenaje de crioviales, (b) contenedor Corning Coolcell y (c) crioviales estériles T311-3 (Simport).

## CAPÍTULO 4

---

# La necrosis del escapo floral de brócoli causada por *Pythium ultimum*

### 4.1. Introducción

En este trabajo se identificó el oomiceto ubicuo patógeno del suelo, *Pythium ultimum* Trow, (1901), sin. *Globisporangium ultimum* (Trow) Uzuhashi, Tojo y Kakish creciendo, junto a varias especies de bacterias en el interior del escapo floral del brócoli. En un principio, se desconocía la implicación de cada uno de los microorganismos en la patología que presentaba el vegetal.

*Pythium ultimum* pertenece a la familia Pythiaceae, clase Oomycetes. Este patógeno fue aislado y descrito por primera vez por Trow en 1901, quien lo consideró una especie no parasitaria. Sin embargo, ahora es bien sabido que este pseudohongo es un patógeno del suelo que causa marchitamiento de plántulas (“damping-off”) y pudrición de la raíz en numerosas plantas (Martin y Loper, 1999) y se considera como una especie patógena que tiene una amplia distribución a nivel mundial (Van der Plaats-Niterink, 1981).

Algunas especies del género *Pythium* atacan una amplia variedad de cultivos y afectan principalmente a tejidos vegetales inmaduros (Babai-Ahary *et al.*, 2004) y plantas estresadas (Lévesque *et al.*, 2010). Estas especies infectan semillas y causan la muerte de plántulas en pre y post-emergencia por marchitamiento en tomate, soja y rúcula silvestre, respectivamente (Salman *et al.*, 2012; Navi *et al.*, 2019; Manganiello y Pane, 2021). También se han detectado infectando repollo chino (Tanina *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2020) y raíces de alfalfa (Larkin *et al.*, 1995). En brócoli, melón, zanahoria, pepino, trigo, algodón, repollo y otras especies vegetales pueden causar pudrición en la raíz de plantas adultas (Sedki y El-Mohamedy, 2012; Erper *et al.*, 2020), así como en otras especies de

brasicáceas, como la coliflor (Abdelzaher, 2003).

Los síntomas causados por *Pythium* sp. en los tallos de brócoli fueron similares a primera vista a los de la pudrición blanda causada por algunas especies bacterianas, incluida la bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Smith, (1896), también conocida como *Pectobacterium carotovorum* Jones, (1901). Sin embargo, Hildebrand (1989) y Canaday (1992) aislaron una gran variedad de bacterias que causaron pudrición blanca bacteriana tanto en los floretes, como en los tallos, cuyos síntomas fueron similares a los descritos en este trabajo. De esta forma, algunas especies del género *Pectobacterium* como *Pectobacterium carotovorum* (Ren *et al.*, 2000), y otras del género *Pseudomonas*, como *P. fluorescens*, *P. marginalis*, *P. viridiflava*, etc., (Koike *et al.*, 2007) fueron las responsables de la enfermedad blanda bacteriana y los síntomas podían aparecer tanto en los floretes como en los tallos. Esos síntomas de la enfermedad bacteriana consisten en una podredumbre oscura y acuosa en la superficie de las cabezas florales o brotes de brócoli, tal y como lo describen Koike *et al.* (2007). Esta enfermedad se denomina comúnmente podredumbre blanda bacteriana o cabeza bacteriana y es muy común que parasite vegetales del género *Brassica* (Bartz y Eckert, 1987; Snowdon, 1991), concretamente en la inflorescencia (cabeza) y en el tallo del brócoli. Sin embargo, la sintomatología observada en este estudio no fue la misma que la descrita como podredumbre blanda bacteriana y podría describirse como una descomposición marrón suave del tejido del tallo interno de la cabeza del brócoli (cilindro vascular y corteza). La enfermedad de los floretes no se ha observado en la enfermedad descrita en este trabajo. Inicialmente, esta descomposición fue seca y marrón y finalmente, con el tiempo, todo el tejido se maceró (Figura 4.2). Por esta razón, se puede concluir que estos síntomas fueron muy similares a los descritos como podredumbre blanda bacteriana y el diagnóstico preliminar podría ser incorrecto.

En un principio, la conexión entre la pudrición blanda bacteriana y la podredumbre por *Pythium* no estaba del todo clara, porque se aislaron e identificaron dos especies bacterianas justo en el margen del tejido lesionado, mientras que otras hifas de *P. ultimum* solo se observaron dentro de las lesiones. Estas especies bacterianas marginales fueron *Pseudomonas putida* y una especie del género *Ochrobactrum*, ambas especies son típicas del rizoplaneo de las plantas y no se ha descrito actividad

fitopatógena.

Hasta ahora, *Pythium* sp. ha sido descrito como patógeno de plántulas de la familia Brassicaceae, que causa síntomas definidos como ahogamiento o marchitamiento de plántulas, también conocido como “damping-off”, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, este pseudohongo también puede causar la pudrición de la raíz de las plantas maduras (Sedki y El-Mohamedy, 2012).

El primer informe de podredumbre del tallo del brócoli causada por *P. ultimum* fue publicado por Kubota *et al.* (1995) en Japón, pero la sintomatología descrita no coincidía exactamente con la que encontramos en este estudio. Estos autores describieron una enfermedad caracterizada por una pudrición acuosa del tallo acompañada de una superficie blanquecina como consecuencia del desarrollo del micelio fúngico. Esta enfermedad causada por *P. ultimum* en el cultivo del brócoli aún no está documentada en España.

Los resultados de este trabajo podrían sentar una buena base científica para la identificación y control de una podredumbre que, hasta la fecha, no se ha registrado en España. Según los síntomas iniciales del diagnóstico, esta enfermedad se identificó en primer lugar como una podredumbre blanda bacteriana. Por tanto, su incidencia podría estar mal identificada hoy en día. El análisis descriptivo de los síntomas de la enfermedad a través de las características visuales requiere experiencia, de cara a la práctica existen otros métodos más rápidos que permiten ayudar a los productores en el manejo de la enfermedad (Pettitt *et al.*, 2002).

Los objetivos de este estudio fueron describir la sintomatología e identificar el microorganismo causante de estos síntomas, conociendo las interacciones microbiológicas que se producían en los tejidos afectados.

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Aislamiento de los microorganismos**

La empresa SAKATA SEED IBÉRICA suministró al laboratorio de Fitopatología del Grupo de Protección de Cultivos de la UPCT varias pellas de brócoli maduras con síntomas de

enfermedad entre noviembre y diciembre del 2012 (Figura 4.2). Las muestras procedían de cultivos de la Región de Murcia (España). Se procedió a aislar y catalogar los microorganismos existentes en el interior de los tejidos dañados, tanto del área macerada, como de la parte adyacente, junto a los haces vasculares. Inicialmente, los escapos florales fueron desinfectados siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1 de materiales y métodos generales. Se recogieron fragmentos del tejido afectado de forma aséptica. Estos fragmentos de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm fueron depositados sobre medio de cultivo sintético de PDA y PCA. Las placas de cultivo fueron incubadas a una temperatura constante de 26 °C durante 10 días. Se obtuvieron un total de siete aislados bacterianos morfológicamente distintos y tres aislados de hongos, todos con morfología similar, utilizando el aislado fúngico que denominamos BRSA-02 como cepa representativa de este estudio.

#### **4.2.2. Identificación fenotípica de los microorganismos**

El análisis de las bacterias se desarrolló a partir de subcultivos crecidos en PCA durante 2 días a 26 °C, que provenían de los aislados de los tejidos vegetales de brócoli afectados, inicialmente sembrados. Se aplicó la técnica del agotamiento del asa con el objetivo de aislar colonias bacterianas individuales. Estos aislados fueron clasificados según la morfología, color, contorno y elevación. Además, se les realizaron otras pruebas fenotípicas dirigidas a detectar la existencia de bacterias pectinolíticas, que pudieran estar asociadas con la enfermedad. Para ello, se llevó a cabo la prueba pectinolítica de la patata, tinción de Gram, metabolismo de la glucosa en medio de cultivo O/F o Hugh-Leifson y prueba de producción de pigmentos fluorescentes o pioverdinas bajo luz UV. Se tuvieron en cuenta los métodos descritos por Andrés-Yeves *et al.* (1991) para la realización de estas pruebas (sección 3.2.1 materiales y métodos generales).

En relación con el aislado fúngico, BRSA-02 fue repicado en varias ocasiones sobre PDA hasta alcanzar su purificación; una vez se desarrolló alrededor de los bordes de los fragmentos de tejido sembrados (Figura 4.3). Sin embargo, no aparecieron estructuras reproductivas en esas condiciones. Por este motivo, se aplicaron otros medios de cultivo diferenciales a diferentes temperaturas de incubación para obtener esas estructuras y permitir su clasificación en un género fúngico antes del análisis molecular.

#### 4. La necrosis del escapo floral de brócoli causada por *Pythium ultimum*

El aislado BRSA-02 se sembró en los siguientes 12 medios de cultivo diferenciales cultivados a 10, 20 y 30 °C: agar de centeno, agar de centeno A, agar de centeno B, PDA, agar de jugo clarificado de V-8 al 10%, agar de jugo clarificado de V-8 al 10% +  $\beta$ -sitosterol, agar de jugo sin clarificar de V-8 al 10%, agar de jugo sin clarificar de V-8 al 10% +  $\beta$ -sitosterol, agar de zanahoria, agar de harina de maíz, agar de frijol lima y agar dextrosa de guisante. Se incorporó  $\beta$ -sitosterol para estimular la producción de oogonios. Además, se agregó extracto de suelo estéril y agua estéril a algunos cultivos para inducir las máximas estructuras reproductivas.

Los medios de cultivo de agar de zanahoria, agar de extracto de harina de maíz y agar de extracto de frijol lima se prepararon como se describe en Drenth y Sendall (2001); agar dextrosa de guisante fue según Anónimo (1973); agar de centeno A y B, agar clarificado de V-8 al 10% con y sin  $\beta$ -sitosterol por el procedimiento de Caten y Jinks (1968) y agar no clarificado de V-8 con o sin  $\beta$ -sitosterol por el método descrito por Miller (1955).

##### **4.2.3. Identificación molecular de los microorganismos**

Los aislados bacterianos fueron identificados mediante secuenciación del ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S) de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 3.3.1 de materiales y métodos generales. Se seleccionaron dos de los siete aislados morfológicos obtenidos (F y G), que estaban presentes en el tejido contiguo al tejido dañado, en un área aparentemente intacta bajo el tejido cortical del tallo (Tabla 4.1). Estos aislados fueron seleccionados porque se aislaron de los tejidos internos adyacentes a las lesiones y por ser típicas bacterias descritas como asociadas al rizoplasma. Se dio prioridad a estos factores para su selección a pesar de que dieron negativo en la prueba de actividad pectinolítica (Tabla 4.1).

Para confirmar la identidad molecular de BRSA-02 se analizó la secuencia de ADN del espaciador transcrito interno 1 (ITS1) y 2 (ITS2) del ADN ribosomal (ADNr), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.2.1 de materiales y métodos generales. Se utilizó uno de los cultivos purificados que había crecido durante 3 días a 26 °C en PDA, empleando tres repeticiones del mismo.

El análisis filogenético y molecular evolutivo se llevó a cabo teniendo en cuenta las indicaciones que aparecen en el apartado 3.4 de materiales y métodos generales. Se descargaron 18 secuencias del GenBank, alineándolas y editándolas manualmente. Hubo un total de 470 posiciones en el conjunto final de datos. La secuencia de *Fusarium solani* (MG734215) se utilizó como grupo externo.

#### **4.2.4. Confrontación *in vitro* de los microorganismos implicados**

Con el objetivo de comprobar la interacción entre BRSA-02 y las bacterias que habían sido aisladas en el tejido contiguo a los síntomas de enfermedad, se procedió a desarrollar un conjunto de ensayos de confrontación duales. Estas pruebas se realizaron en dos medios de cultivo diferentes, PDA y PCA. Con el primero se buscaba favorecer el crecimiento del hongo frente a las bacterias, dado su pH ácido (5,5); mientras que con el segundo se trataba de estimular el efecto contrario, es decir, favorecer el crecimiento de las bacterias frente a BRSA-02, como consecuencia del pH neutro del medio (7,0). Para estos experimentos, se utilizaron subcultivos crecidos en PDA durante 3 días a 26 °C de cada microorganismo.

Hubo un total de 4 tratamientos: (BRSA-02 + aislado G), (BRSA-02 + aislado F), (BRSA-02 + aislado G + aislado F) y un testigo de BRSA-02 creciendo de forma aislada. Se hicieron 4 repeticiones por tratamiento y la temperatura de incubación fue de 26 °C.

Las siembras de BRSA-02 se realizaron colocando un pequeño fragmento de micelio (5 x 5 mm) en un extremo de una placa con medio de cultivo (PDA o PCA). En el extremo opuesto se sembraron las bacterias en una única estría.

Dada la alta velocidad de crecimiento de BRSA-02, las líneas de siembra de las bacterias se realizaron 4 días antes que la siembra del hongo, ya que estas pueden presentar sustancias inhibitoras del crecimiento. Para que esto ocurra, que no siempre se da el caso, es necesario que se desarrollen con plenitud en su fase exponencial de crecimiento, antes de que el micelio del hongo llegue a su línea de siembra.

La realización de este diseño tenía como objetivo valorar la interacción entre BRSA-02 y las bacterias aisladas cuando crecieron confrontados en un medio de cultivo sintético. Esta técnica permite evidenciar el posible sinergismo o antagonismo entre los microorganismos implicados a través de la caracterización de la tasa de crecimiento del

hongo y de otras variables propuestas a estudio. Además, con este método se posibilita la detección de sustancias inhibidoras de crecimiento sobre el hongo y a través del uso de la microscopia, podemos conocer los posibles daños morfológicos que las bacterias pueden causarle al mismo.

Las variables empleadas para determinar la interacción entre los organismos fueron: el área de desarrollo de la colonia, la tasa de crecimiento y la duración de la fase lineal; que se describen en el apartado 3.2.2 de materiales y métodos generales. El tratamiento de los resultados y los equipos de imagen utilizados para la caracterización fenotípica de los microorganismos también queda especificado en dicho apartado.

#### **4.2.5. Desarrollo de poblaciones mixtas de los microorganismos implicados creciendo *in vitro***

La realización de este diseño tenía como objetivo comprobar la interacción entre BRSA-02 y las bacterias aisladas (aislado G y aislado F) cuando crecían juntos en medio de cultivo sintético, tal y como lo hacían en el momento en el que se aislaron del tejido del escapo floral de los vegetales afectados.

Con este fin, se realizaron inicialmente subcultivos de cada uno de los tres microorganismos, crecidos en PDA a 26 °C.

Se desarrollaron un total de 7 tratamientos: cuando los microorganismos eran sembrados el mismo día (BRSA-02 + aislado G) y (BRSA-02 + aislado F); cuando la bacteria era inoculada 24 horas antes que BRSA-02 (aislado G – BRSA-02) y (aislado F – BRSA-02) y cuando BRSA-02 era sembrado 24 horas antes que la bacteria (BRSA-02 – aislado G) y (BRSA-02 – aislado F).

Estos tratamientos se completaban con un testigo de BRSA-02 creciendo solo (testigo). El medio de cultivo utilizado para llevarlo a cabo fue PDA, dado que permite tanto el desarrollo del hongo como el de las bacterias.

Si la siembra del hongo se hacía el mismo día que la bacteria: (BRSA-02 + aislado G) y (BRSA-02 + aislado F). Primero se inoculaba la bacteria con la ayuda de un asa de siembra en la zona central de la placa con PDA, para después colocar el fragmento de micelio del hongo (5 x 5 mm, en todos los casos) justo encima.



Cuando la siembra de la bacteria era previa a la del hongo: (aislado G – BRSA-02) y (aislado F – BRSA-02), se hacía igual que en los tratamientos anteriores, pero depositando el fragmento de micelio del hongo 24 horas después del inóculo bacteriano.

Para los tratamientos en los que BRSA-02 era sembrado antes que la bacteria: (BRSA-02 – aislado G) y (BRSA-02 – aislado F). A las 24 horas de haber depositado el hongo, se cogía con un asa de siembra en picadura una pequeña cantidad de la bacteria correspondiente y se pinchaba ligeramente el fragmento de agar del hongo que se depositó con anterioridad en el centro de la placa con PDA, para que la bacteria inoculada tocara tanto el medio de cultivo como el hongo.

Se hicieron 4 repeticiones por tratamiento y la temperatura de incubación se mantuvo a 26 °C durante todo el procedimiento.

En esta experiencia se midieron las mismas variables citadas en el punto 4.2.4 y descritas en el apartado 3.2.2 de materiales y métodos generales. El tratamiento estadístico de los resultados se realizó de igual forma que en la descripción realizada en dicho apartado.

Las hifas del hongo fueron examinadas al cuarto día de desarrollo en todos los tratamientos definidos. Esta acción tenía como objetivo detectar posibles cambios o anomalías en las estructuras morfológicas de BRSA-02 al crecer en contacto con las bacterias. Se examinaron al microscopio las hifas aéreas y sumergidas en el medio de cultivo de todos los tratamientos, registrando el grosor de las mismas y otras observaciones de interés.

#### **4.2.6. Inoculación de los microorganismos a piezas de tejidos vegetales sanos**

A finales de enero de 2014 se cosecharon de un cultivo del Campo del Cartagena 35 piezas de brócoli de una variedad comercial que se cultiva en la zona (no se especifica por razones comerciales). Las pellas se almacenaron en una cámara frigorífica durante 3 días a 5 °C antes del inicio de la prueba. Para su inoculación, se utilizaron cultivos jóvenes de BRSA-02 y de las bacterias (aislado G) y (aislado F), creciendo en PDA y PCA respectivamente durante 5 días (BRSA-02) y 24 horas (bacterias) a una temperatura de incubación de 26 °C.

#### 4. La necrosis del escapo floral de brócoli causada por *Pythium ultimum*

Para la inoculación de los microorganismos a fragmentos de tejido del escapo floral se preparó el material vegetal que iba a ser inoculado. Se separó el tallo floral del resto de la inflorescencia con la ayuda de un cuchillo, la desinfección se llevó cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 3.1 de materiales y métodos generales. Una vez desinfectados los tallos florales, se eliminó una fina sección de la parte basal y apical de los mismos mediante un corte aséptico transversal, dejando una longitud de tejido homogénea de aproximadamente 10 cm. A continuación, se dividieron las 30 piezas de escapos florales en grupos de 5 y se depositaron en bandejas individuales para llevar a cabo su inoculación en una cabina de flujo laminar. Se establecieron 7 tratamientos diferentes: a) BRSA-02, b) aislado F, c) aislado G, d) BRSA-02 + aislado F, e) BRSA-02 + aislado G, f) BRSA-02 + aislado F + aislado G y control.

El procedimiento de inoculación varió en función del tipo de microorganismo que se inoculaba. BRSA-02 se inoculó a los tallos cortando, con un bisturí aséptico, una porción de agar de la colonia donde crecía. A continuación, se hizo una hendidura de tamaño similar a la porción en la zona central del tallo floral y se puso en contacto directo el fragmento de agar con esta área. Como quedaba al descubierto, para evitar el desplazamiento del mismo se hizo pasar una cinta adhesiva que permitiera su sujeción.

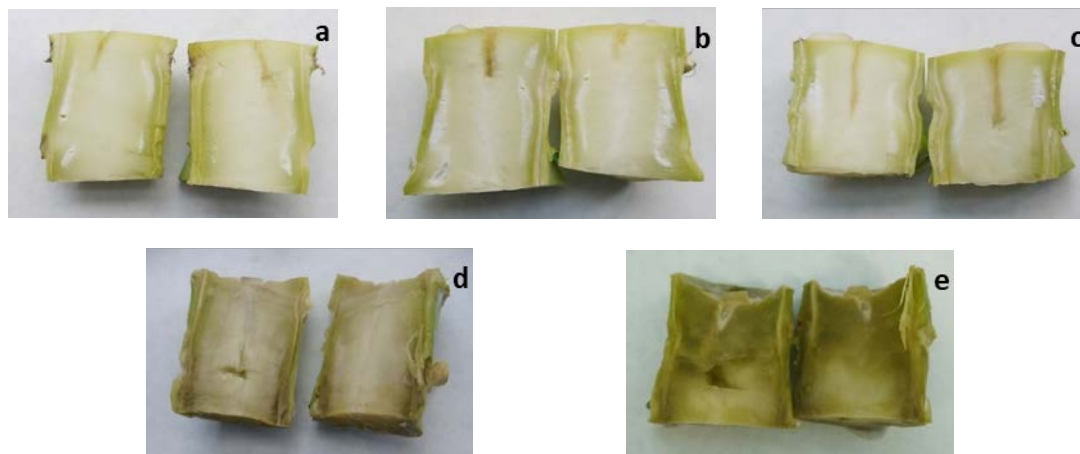
Para la inoculación de las bacterias se preparó una suspensión de las mismas en agua destilada estéril. La dosis infectiva fue ajustada mediante una cámara de recuento tipo Thoma. La concentración de los inóculos infectivos fue la siguiente:  $4,6 \times 10^7$  bacterias/mL (aislado G) y  $3,8 \times 10^7$  bacterias/mL (aislado F).

Las bacterias fueron inoculadas mediante un punzamiento en la zona del tejido de la médula del tallo. Se realizó un agujero de aproximadamente 1,5 cm de profundidad con la ayuda de un punzón estéril. Entonces, mediante una pipeta, se depositó la mezcla de agua estéril y bacterias (50  $\mu$ L). Para la siembra combinada de ambas bacterias, se mezcló 1 mL de cada suspensión, inoculando el mismo volumen (50  $\mu$ L). El control fue inoculado con agua destilada estéril.

Todas las bandejas de cada tratamiento que contenían las piezas inoculadas fueron almacenadas a temperatura y humedad relativa ambiente (18 °C y 94%, respectivamente) durante 10 días. Se creó una alta humedad relativa en el interior de las bandejas, colocando un vaso con agua en el interior de las mismas y cubriéndolas

parcialmente con una bolsa de plástico, sin que se llegase a impedir el intercambio gaseoso normal.

Los resultados fueron evaluados según una escala visual de incidencia y severidad (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Grados de incidencia de los síntomas observados de la enfermedad en las piezas del tallo de brócoli. (a) asintomático (0), (b) síntoma atípico por coloración anormal (1), (c) síntoma típico por hipertrofia (2), (d) síntoma típico leve (3) y (e) síntoma típico medio (4).

## 4.3. Resultados

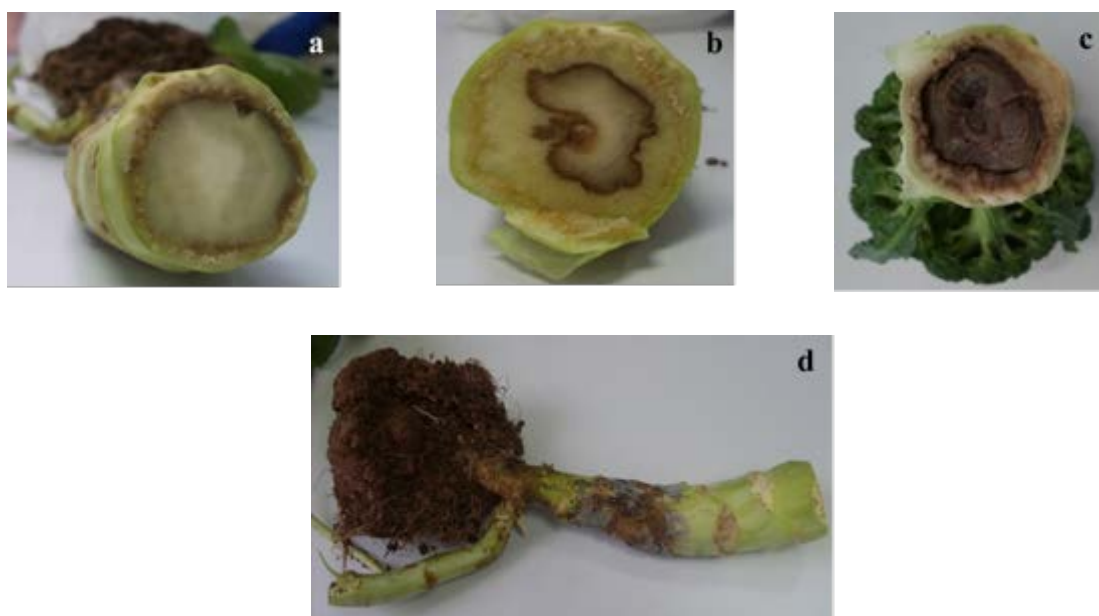
### 4.3.1. Etiología y descripción de la sintomatología

La sintomatología que tratamos de definir en este trabajo se evidenció por una descomposición acuosa de la médula de las piezas afectadas, el tejido más afectado perdió consistencia y tornó de una coloración con tonalidades verdes a otra con ciertos matices pardos (Figura 4.2). En un inicio, el anillo vascular apareció muy marcado y el tejido de la médula estaba descompuesto (Figura 4.2a). Posteriormente, la descomposición del tejido se acentuó y necrosó completamente (Figura 4.2c). A veces, aparecieron síntomas de pardeamiento interno formándose un anillo irregular de color ocre oscuro. Esto ocurre cuando la descomposición del tejido no es muy avanzada (Figura 4.2b).

Esta enfermedad puede pasar desapercibida sino se hace una incisión. Además, las hojas de la planta pueden dificultar la visualización de la tonalidad parda que en ocasiones aparece en el tallo. Sin embargo, se pudieron observar algunos patógenos secundarios

#### 4. La necrosis del escapo floral de brócoli causada por *Pythium ultimum*

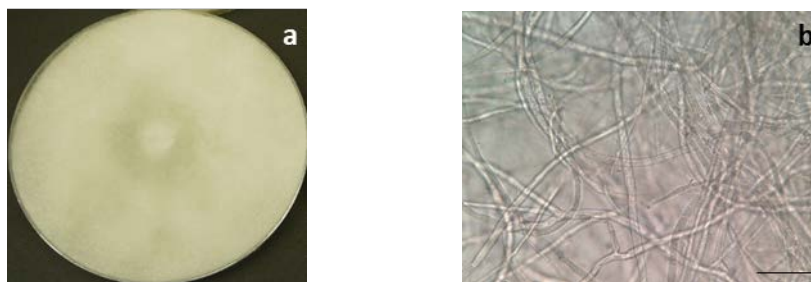
en tejidos de tallos totalmente afectados por la enfermedad como el hongo *Botrytis cinerea* (Figura 4.2d). En esta ocasión, actúa como patógeno oportunista, aunque haya sido descrito como patógeno común del brócoli que causa el moho gris. Los síntomas de la enfermedad aparecieron en el cultivo durante el mes de noviembre, periodo en el que la temperatura y la precipitación media en la Región de Murcia fue 12,3 °C y 66 L/m<sup>2</sup>, considerándose un mes entre “normal-frío” y “muy húmedo”, si se comparan los valores medios de estos parámetros con los de otros años (AEMET, 2012).



**Figura 4.2.** Síntomas internos de la podredumbre del tallo de brócoli. (a) apariencia inicial (médula blandeada y anillo pardeado), (b) anillo irregular de color ocre oscuro, observado en ocasiones en fases no muy avanzadas de la podredumbre, (c) síntoma avanzado, médula completamente descompuesta, pardeamiento y anillo oscurecido bajo la corteza del tallo floral y (d) pieza del escapo floral que presentaba maceración de la médula desde el cuello hasta la zona de corte. Además, se puede apreciar un pardeamiento exterior en la sección intermedia.

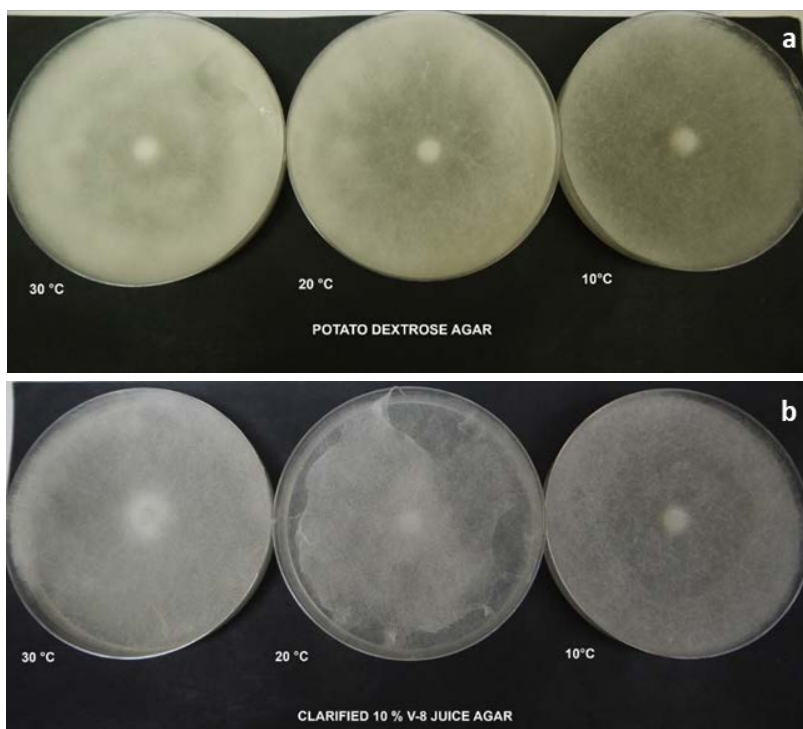
#### 4.3.2. Caracterización fenotípica de los microorganismos

De la observación directa del tejido de los tallos florales dañados por la sintomatología definida, se apreció la existencia de hifas fúngicas hialinas y no septadas o con pocos tabiques (Figura 4.3b). De las siembras definidas en el apartado 4.2.1 se pudieron aislar varias especies fúngicas con la misma morfología, de micelio aéreo laxo y blanquecino (Figura 4.3a) y varias especies bacterianas.



**Figura 4.3.** Aislado BRSA-02 de *Pythium ultimum*. (a) aspecto del micelio de BRSA-02 cultivado en PDA después de ser aislado de tallos de brócoli afectados por la podredumbre blanda y (b) detalle de las hifas del oomiceto existente en el tejido afectado. Barra de escala: b = 20  $\mu$ m.

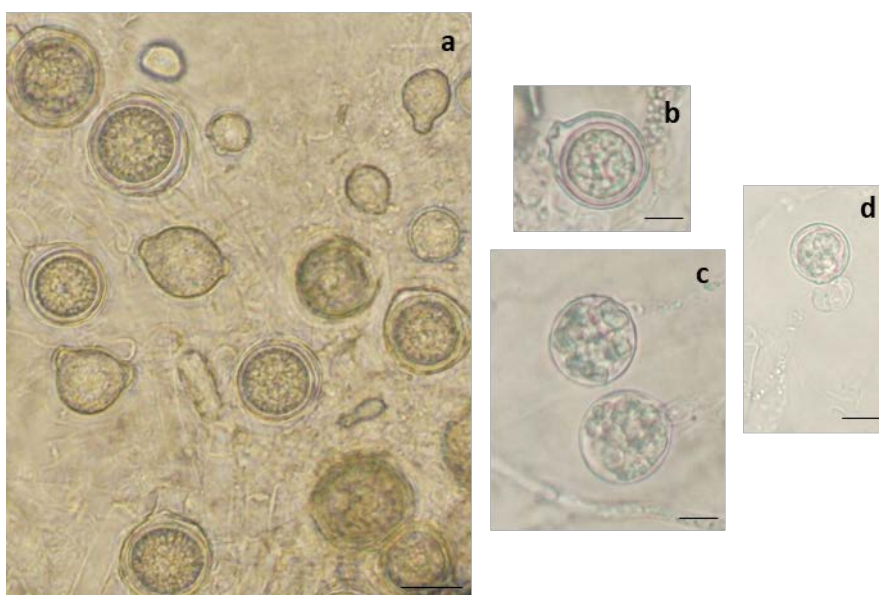
Como no se formaban estructuras de reproducción en el hongo, se probaron otros medios de cultivo con este objetivo, tal y como se describe en el apartado 4.2.2. Este procedimiento permitía identificar el género del hongo. El crecimiento de micelio fue abundante en PDA porque este es un medio rico en nutrientes (Figura 4.4a). Sin embargo, utilizando especialmente el agar de jugo clarificado de V-8 al 10%, estimulamos la formación de hinchamientos hifales intercalares y de oosporas. El aislado desarrolló un micelio menos denso que creciendo en PDA (Figura 4.4b), tal vez porque parte de la energía la usó para producir estructuras de esporulación previo al agotamiento de los nutrientes.



**Figura 4.4.** Aislado BRSA-02 de *Pythium ultimum* en diferentes medios de cultivo a distintas temperaturas de incubación (10, 20 y 30 °C). (a) aspecto de BRSA-02 cultivado en agar de patata y dextrosa y (b) agar de jugo clarificado de V-8 al 10%.

#### 4. La necrosis del escapo floral de brócoli causada por *Pythium ultimum*

Además, obtuvimos más información sobre el desarrollo de BRSA-02 mediante la aplicación de medios diferenciales. De esta manera, el agar de frijol de lima, el agar de guisante y el agar de jugo sin clarificar de V-8 al 10% fueron medios adecuados para cultivar *Pythium ultimum* BRSA-02, pero no fueron apropiados para formar estructuras reproductivas. En el agar de harina de zanahoria se podían formar hinchamientos de hifas, pero no era bueno para formar estructuras sexuales como anteridios, oogonios y oosporas. Por el contrario, el agar de maíz, el agar de jugo clarificado de V-8 al 10% modificado con antibióticos o  $\beta$ -sitosterol funcionaron bien para formar estructuras de reproducción.



**Figura 4.5.** Estructuras reproductivas obtenidas de *Pythium ultimum* BRSA-02 cultivado en agar jugo clarificado de V-8 al 10%. (a) hinchamientos hifales intercalares, (b) oospora aplerótica madura, (c) oospora joven y (d) anteridio monoclino unido a un oogonio joven. Barra de escala: a = 20  $\mu$ m; b, c y d = 10  $\mu$ m.

*P. ultimum* BRSA02 produjo hinchamientos hifales intercalares de 12 a 28  $\mu$ m de diámetro (Figura 4.5a) y numerosas oosporas (Figura 4.5a). Los hinchamientos hifales surgieron de las células intercalares y tenían forma de barril cuando crecían en medio V-8 modificado con agua estéril o extracto de suelo estéril. Las oosporas apleróticas eran lisas, frecuentemente ubicadas en la punta de las hifas; de morfología esférica con 14,7-18,3  $\mu$ m de diámetro y no llenaban toda la cavidad del oogonio (oosporas apleróticas) (Figura 4.5b). Son producto de la unión de anteridios monoclinos a un oogonio joven. Los oogonios eran globosos y tenían 19,6-22,9  $\mu$ m de diámetro. En estado inmaduro, los oogonios estaban llenos de vesículas lipídicas (Figura 4.5c). La pared de la oospora se

engrosó enormemente debido a la deposición de los materiales de pared, probablemente  $\beta$ -1,3 glucanos para el almacenamiento de la energía. El anteridio monoclinico que se originó inmediatamente debajo del oogonio, emergió del ápice de la hifa con un oogonio (Figura 4.5d). El citoplasma de las oosporas maduras latentes estaba densamente lleno de glóbulos lipídicos, lo que le daba una apariencia densamente granular (Figura 4.5c).

En relación a las bacterias, se seleccionaron siete aislados bacterianos diferentes de acuerdo con la morfología de sus colonias y fueron nombrados mediante acrónimos o claves (A-G). Los resultados de las pruebas fenotípicas a las que se sometieron se especifican a continuación:

**Tabla 4.1.** Pruebas fenotípicas realizadas a los diferentes aislados de bacterias seleccionadas, obtenidas del interior de la médula dañada de tallos florales de brócoli.

Aislado	Actividad pectinolítica	Metabolismo de la glucosa (O <sup>a</sup> /F <sup>b</sup> )	Pioverdinas
A	+	+/+	-
B	-	+/+	-
C	+	+/-	+
D	-	+/+	-
E	-	+/+	-
F	-	+/-	+
G	-	+/-	-

*Nota.* <sup>a</sup>O: metabolismo oxidativo de la glucosa. <sup>b</sup>F: metabolismo fermentativo de la glucosa.

Estas pruebas pusieron de manifiesto la existencia de dos aislados (A y C) que cumplían con el requisito básico de poder ser clasificados como bacterias pectinolíticas, condición fundamental para que desarrolle una podredumbre blanda bacteriana. Pero estas bacterias solamente se aislaron del tejido ya dañado en combinación con las hifas del *P. ultimum* BRSA-02.

El aislado A, tenía un metabolismo anaerobio facultativo de la glucosa, gramnegativa y no presentó pigmentos pioverdinas, siendo buen candidato a ser clasificado como *Erwinia carotovora*, a falta de un análisis genético que lo encuadre a nivel taxonómico. Por otro lado, el aislado C, tenía un metabolismo aerobio facultativo de la glucosa, gramnegativa y producía pigmentos pioverdinas, pudiendo clasificarse inicialmente como una *Pseudomonas* pectinolítica del grupo fluorescente, tal como *P. marginalis* (*P. fluorescens*) o *P. viridiflava*.

Los aislados F y G fueron obtenidos del tejido limítrofe al tejido macerado, donde también estaba presente *P. ultimum* BRSA-02. Ambas bacterias resultaron no tener actividad pectinolítica, eran aerobias y una de ellas (aislado F), presentó pigmentos pioverdinas, por lo que inicialmente pertenecía al género *Pseudomonas*. Las colonias del aislado G eran, en ambos medios de cultivo, de color blanco y convexas, mientras que las colonias del aislado F eran de color pardo y planas. Ambos aislados fueron seleccionados para su caracterización molecular.

Los aislados restantes del tejido macerado (B, D y E), debían ser bacterias saprófitas u oportunistas, provenientes de las poblaciones comensales de la superficie de los tejidos, que utilizan como vía de entrada las aberturas ocasionadas por el patógeno o bien las heridas del tallo, acompañando a los microorganismos causantes de podredumbres blandas en la maceración de los tejidos.

#### **4.3.3. Caracterización molecular de los microorganismos**

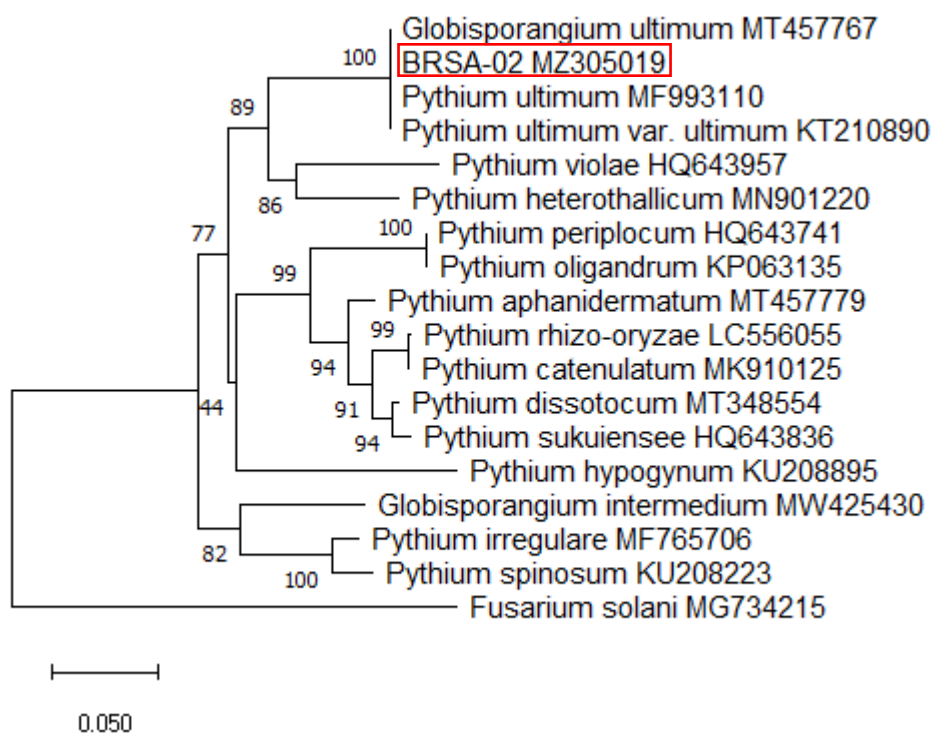
Las pruebas PCR descritas en el apartado 4.2.3, indicaron la presencia de *Pseudomonas putida* (aislado F), mientras que el aislado G era una bacteria con una alta afinidad al género *Ochrobactrum*. Ambas bacterias se aislaron en el área del tejido medular, adyacente al tejido macerado junto al hongo. Creemos que estas bacterias, sin ser fitopatógenas, se asocian al hongo siendo este el potencial causante de la enfermedad.

En relación a *Pythium ultimum* (BRSA-02), hay que considerar que la ausencia inicial de ciertas estructuras morfológicas de diagnóstico obligó a realizar un análisis molecular con el fin de evitar errores de identificación. Los resultados de la caracterización morfológica destacaron la importancia de desarrollar este análisis, especialmente en un género que presenta una alta variabilidad en sus estructuras más importantes (Belbahri *et al.*, 2006). Los análisis moleculares que utilizan las regiones ITS (“Internal Transcription Spacer”) del ADNr se han utilizado con frecuencia para identificar especies de *Pythium* (Matsumoto *et al.*, 1999; Belbahri *et al.*, 2006). Sin embargo, la complejidad del género llevó a Uzuhashi *et al.* (2010) a analizar la secuencia de la región D1/D2 del ADN ribosómico de subunidad grande y la región del gen citocromo oxidasa II para mejorar la filogenia de *Pythium* y otras especies relacionadas. Como consecuencia de esta investigación, se propusieron cuatro nuevos géneros basados en la filogenia y



morfología de las especies clasificadas como *Pythium* hasta ese momento. Los géneros fueron *Ovatisporangium*, *Globisporangium*, *Elongisporangium* y *Pilasporangium*.

Los resultados mostraron que las tres repeticiones del aislado BRSA-02 eran iguales porque sus regiones ITS eran idénticas y medían 430 pb. La secuencia de BRSA-02 se depositó en el GenBank con el número de acceso MZ305019 para la región ITS. Se reveló que la secuencia de la región del gen ITS fue 100% idéntica a *Globisporangium ultimum*, sinónimo de *P. ultimum* depositado en la base de datos de NCBI (N.º de acceso MT457767). *Pythium ultimum* Trow ha sido renombrado recientemente como *Globisporangium ultimum* (Trow) Uzuhashi, Tojo & Kakish (Uzuhashi *et al.*, 2010). Se reconstruyó un árbol de unión de vecinos basándonos en las secuencias ITS (Figura 4.6). El aislado BRSA-02 se agrupó junto a la cepa de referencia KT210890 y otra cepa de *P. ultimum* (MF993110). Este resultado confirma que nuestro aislado podía identificarse como *P. ultimum* var. *ultimum*. Además, dicho aislado, fue depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en Valencia, tras ser sometido a pruebas de viabilidad, pureza y autenticidad, previo a su depósito público, asignándole el siguiente código de cepa: CECT 20902.



**Figura 4.6.** Árbol filogenético basado en las secuencias ITS parciales de *Pythium ultimum* BRSA-02 y sus especies relacionadas disponibles en el GenBank utilizando el método de unión de vecinos con una prueba de arranque de 2.000 réplicas. La cepa MG734215 de *Fusarium solani* se utilizó como grupo externo.

El análisis de las secuencias F y G, dio un 99% de similitud con *Pseudomonas putida* (GenBank FJ161217) para el aislado F y un 96% de similitud para *Brucellaceae bacterium* (GenBank HM113640).

#### **4.3.4. Crecimiento *in vitro* de los microorganismos enfrentados**

La prueba de confrontación dual entre el hongo y las bacterias que crecían en la zona colindante al tejido macerado, mostró una interacción positiva especialmente entre la bacteria *Ochrobactrum* sp. (aislado G) y *Pythium ultimum* BRSA-02, tanto cuando crecían en PDA (Figura 4.7), como en PCA (Figura 4.8). El hongo redujo drásticamente su crecimiento al aproximarse a la línea de siembra de la bacteria, deteniendo totalmente su desarrollo antes de llegar a la línea bacteriana (Figura 4.9b).

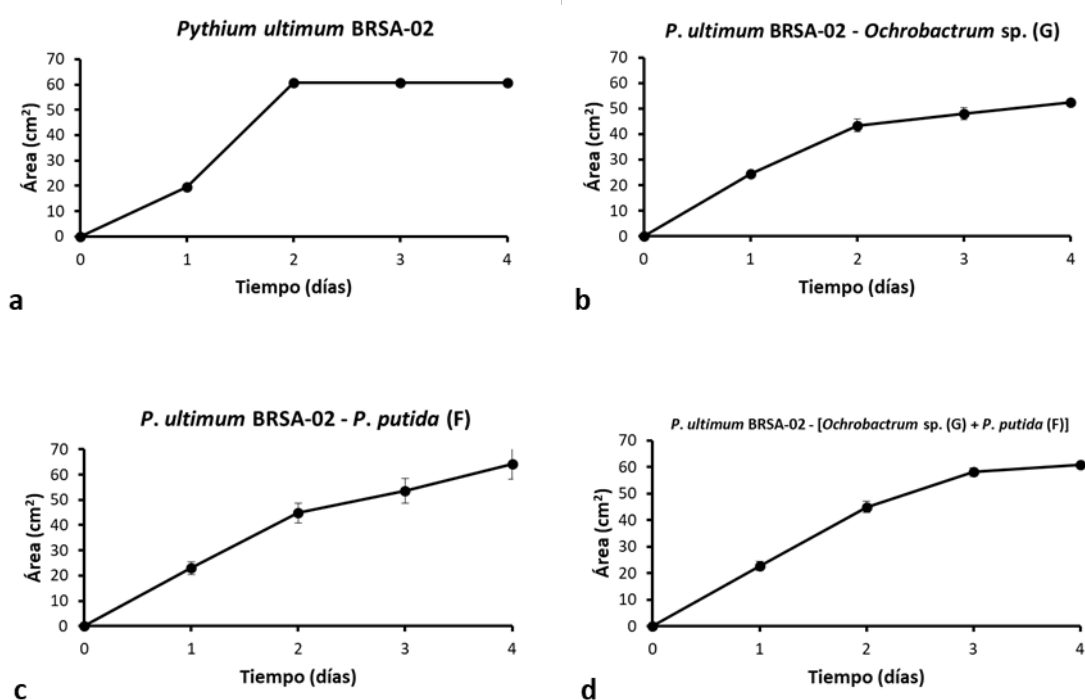
Las curvas de desarrollo micelial de *P. ultimum* BRSA-02 pusieron de manifiesto una cinética típica del hongo cuando se desarrolla en medio de cultivo sólido (Figuras 4.7a y 4.8a). Este tipo de curvas han sido extensamente caracterizadas para diferentes aislados de *Botrytis cinerea* (Martínez *et al.*, 2003a). La bacteria *Ochrobactrum* sp. (G) redujo el desarrollo del micelio de *P. ultimum* BRSA-02 durante su fase lineal de crecimiento, efecto que sugiere que esta especie bacteriana es capaz de producir toxinas difusibles en medio de cultivo sintético contra el hongo (Figuras 4.7b y 4.8b). Este hecho se pudo detectar también en la tasa de crecimiento, concretamente en el segundo día de ensayo para PDA, cuando la velocidad de desarrollo del hongo no alcanzó los 20 cm<sup>2</sup>/día (Figura 4.11b) frente a los 40 cm<sup>2</sup>/día del testigo (Figura 4.11a), en PCA esa tendencia fue más homogénea (4.12b).

Estas toxinas ocasionaron daños en las hifas del hongo, principalmente en las sumergidas, lo que probablemente supuso un impedimento para el crecimiento normal de *P. ultimum* BRSA-02 a su tasa de crecimiento normal. Bajo estas condiciones, las hifas del hongo tenían ramificaciones cortas y eran más gruesas. En ocasiones se apreciaban determinadas malformaciones con forma de abultamientos.

*P. ultimum* BRSA-02 se desarrolló rápidamente a 26 °C; la fase de latencia fue muy breve (datos no presentados), ya que se revisó bajo la lupa binocular que las hifas del hongo comenzaron a crecer pocas horas después de efectuar la siembra en ambos medios de cultivo. Este rápido desarrollo se detectó en la tasa de crecimiento, que para PDA fue

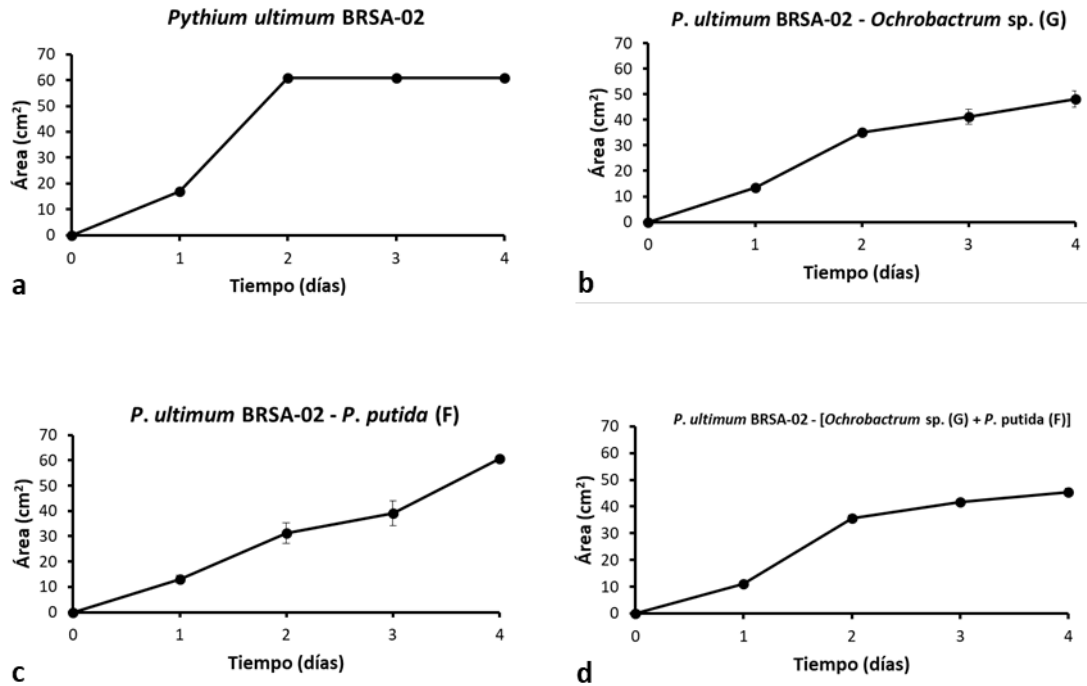
del orden de 20 cm<sup>2</sup>/día y en torno a 16 cm<sup>2</sup>/día para PCA, en el primer día de crecimiento (Figuras 4.11a y 4.12a). La fase exponencial, que normalmente tiene una duración inferior a 20 horas en la mayoría de las especies fúngicas, no se detectó. La fase lineal tuvo una duración inferior a 2 días (Figuras 4.7a y 4.8a), momento en el que el hongo detuvo su desarrollo puesto que había alcanzado el borde de la placa Petri de cultivo.

La presencia de la bacteria *Pseudomonas putida* (aislado F) en confrontación dual retardó el desarrollo del hongo sin detenerlo completamente (Figuras 4.7c, 4.8c y 4.9c), la tasa de crecimiento fue ligeramente superior a cuando *P. ultimum* BRSA-02 crecía junto a *Ochrobactrum* sp. (G), especialmente en PDA (Figura 4.11c). Con la población mixta de ambas especies bacterianas se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con cada especie por separado, siendo más acentuada la disminución del desarrollo del hongo en PCA (Figura 4.8d), efecto que también se detectó en la tasa de crecimiento (Figura 4.12d). *Ochrobactrum* sp. (G) fue la única bacteria capaz de detener el desarrollo de *P. ultimum* BRSA-02, pero este efecto se vio débilmente suprimido cuando esta bacteria se combinó con *P. putida* (F) (Figura 4.9d).

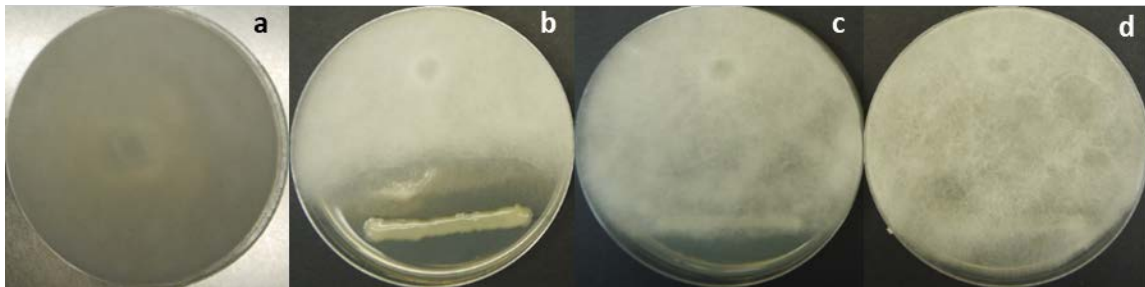


**Figura 4.7.** Desarrollo del micelio de *Pythium ultimum* BRSA-02 creciendo en PDA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c) y (d) presencia de bacterias aisladas. Desviación estándar (n = 4).

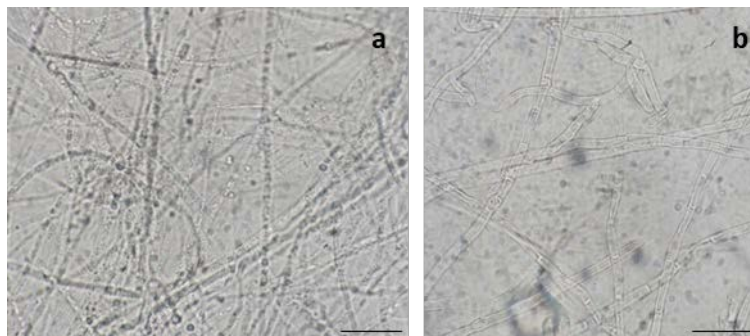
4. La necrosis del escapo floral de brócoli causada por *Pythium ultimum*



**Figura 4.8.** Desarrollo del micelio de *Pythium ultimum* BRSA-02 creciendo en PCA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c) y (d) presencia de bacterias aisladas. Desviación estándar (n = 4).

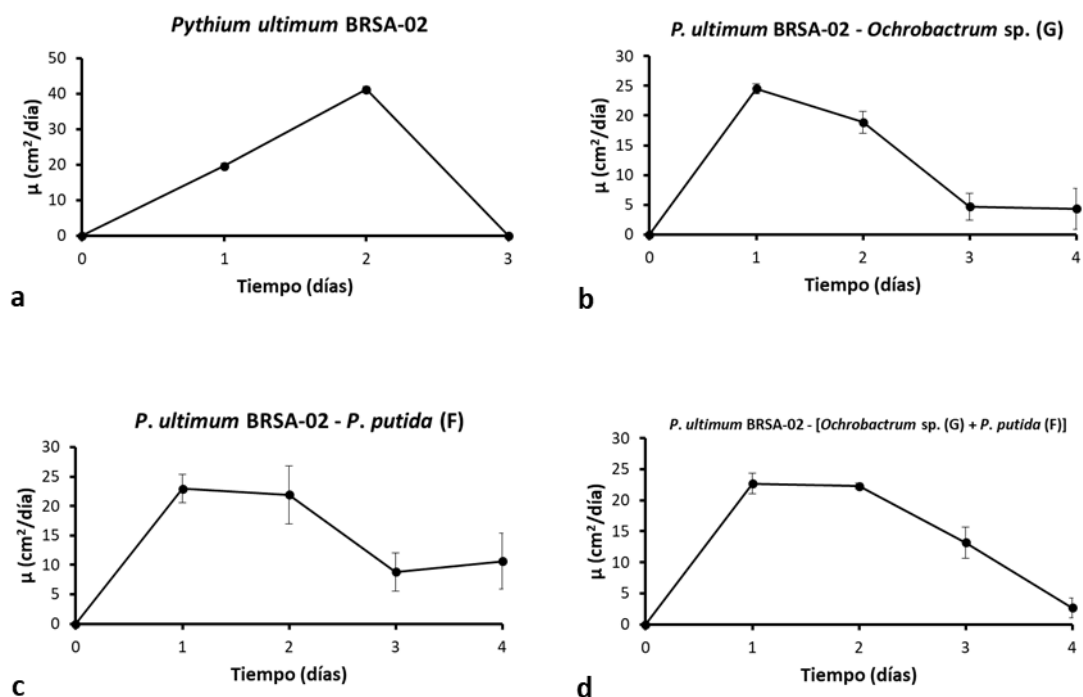


**Figura 4.9.** Cultivos combinados de *Pythium ultimum* BRSA-02 junto a *Ochrobactrum sp.* (aislado G) y *Pseudomonas putida* (aislado F) creciendo en PDA a 26 °C tras 4 días. (a) *P. ultimum* BRSA-02, (b) *P. ultimum* BRSA-02 – *Ochrobactrum sp.* (G), (c) *P. ultimum* BRSA-02 – *P. putida* (F) y (d) *P. ultimum* BRSA-02 – [*Ochrobactrum sp.* (G) + *P. putida* (F)].



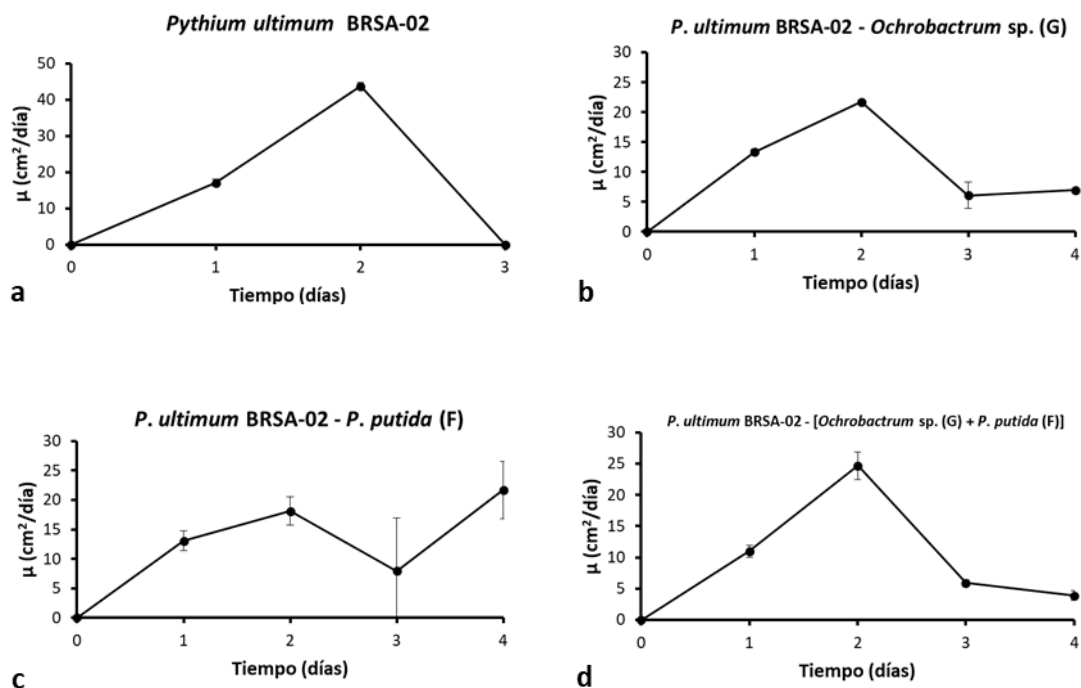
**Figura 4.10.** Daños ocasionados a las hifas sumergidas de *P. ultimum* BRSA-02 debido a la presencia de la bacteria *Ochrobactrum sp.* (aislado G). (a) *P. ultimum* BRSA-02 y (b) *P. ultimum* BRSA-02 junto a *Ochrobactrum sp.* (G). Barra de escala: a y b = 20 µm.

El micelio de *Pythium ultimum* BRSA-02 tenía hifas finas y gruesas, con un grosor que oscilaba entre 3,7-7,5  $\mu\text{m}$ , tanto si crecía en PDA como en PCA. Sin embargo, las hifas gruesas no estaban presentes en el micelio sumergido en el medio de cultivo, o bien eran muy escasas, con un espesor inferior a 5  $\mu\text{m}$ . Cuando el hongo creció en presencia de la bacteria *Ochrobactrum* sp. (aislado G), el micelio aéreo no mostró diferencias significativas, sin embargo, en el micelio sumergido sí se detectaron ciertas diferencias al crecer en presencia de la bacteria (Figura 4.10). Este micelio presentó algunos tabiques creciendo en PDA, ramificaciones cortas de escaso desarrollo, aumento en el grosor de las hifas (hasta 10  $\mu\text{m}$ ) con la presencia de hifas levemente tortuosas, siendo estas deformaciones muy parecidas, aunque no tan pronunciadas, a las desarrolladas en plantas ornamentales por diversos aislados de *Botrytis cinerea* (Martínez *et al.*, 2007). La población mixta de las dos especies bacterianas no afectó a las hifas sumergidas de *P. ultimum* BRSA-02, pero sí a la estructura de las hifas aéreas, alcanzando espesores próximos a 15  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4.11.** Tasa de crecimiento del micelio de *Pythium ultimum* BRSA-02 creciendo en PDA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c) y (d) presencia de bacterias aisladas. Desviación estándar (n = 4).

#### 4. La necrosis del escapo floral de brócoli causada por *Pythium ultimum*

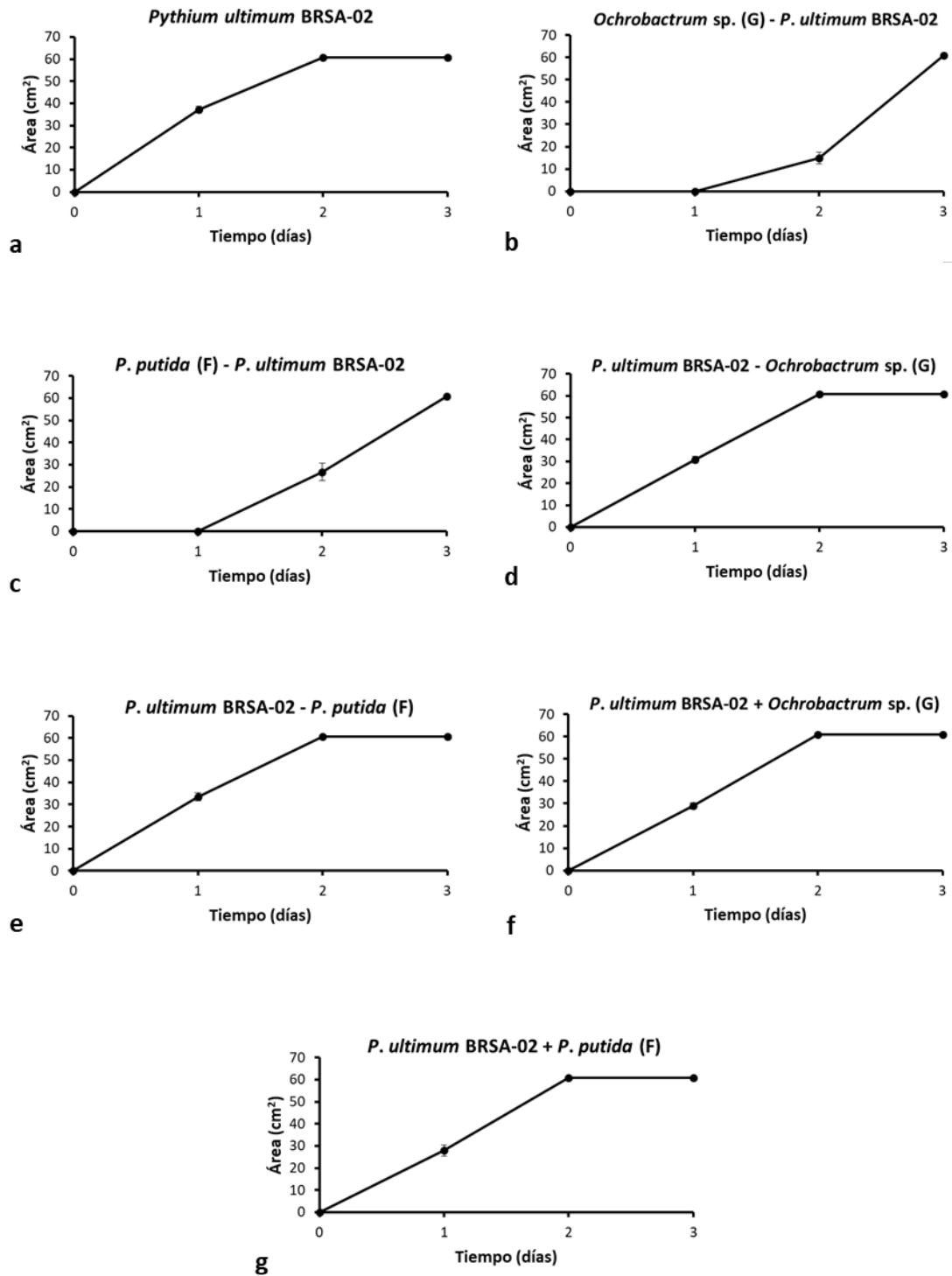


**Figura 4.12.** Tasa de crecimiento del micelio de *Pythium ultimum* BRSA-02 creciendo en PCA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c) y (d) presencia de bacterias aisladas. Desviación estándar (n = 4).

#### 4.3.5. Crecimiento combinado de los microorganismos *in vitro*

La prueba de crecimiento mixto de *P. ultimum* BRSA-02 junto a las bacterias, se llevó a cabo para examinar el efecto en la interacción que podía tener la presencia directa de las hifas del hongo cuando crecían junto a las bacterias. Situación similar a la que se encontró en las pellas de brócoli afectadas por la enfermedad, pero en este caso utilizando medio de cultivo sintético (PDA). Los resultados de este ensayo se pueden comprobar en las Figuras 4.13 y 4.14. La primera hace referencia al resultado de la interacción sobre el crecimiento del hongo y la segunda sobre su tasa de crecimiento.

Cuando *Ochrobactrum* sp. (aislado G) creció al mismo tiempo que *P. ultimum* BRSA-02, redujo notablemente el desarrollo del hongo en los dos primeros días, momento en el que se produce la fase lineal de crecimiento del mismo (Figuras 4.13b y 4.14b).



**Figura 4.13.** Desarrollo del micelio de *Pythium ultimum* BRSA-02 creciendo en PDA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c), (d), (e), (f) y (g) presencia de bacterias aisladas, creciendo en el mismo punto junto al hongo. Desviación estándar (n = 4).

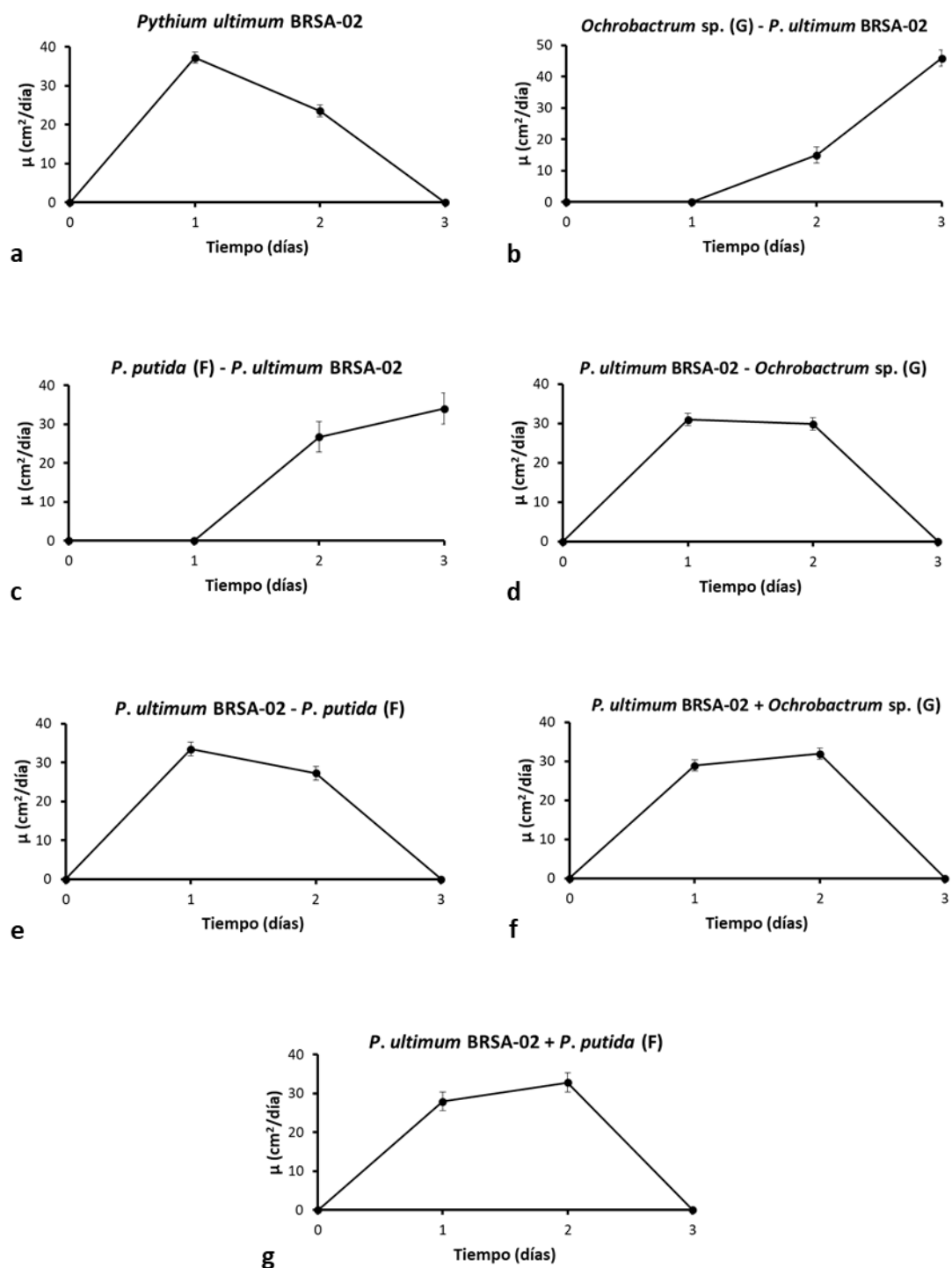
#### 4. La necrosis del escapo floral de brócoli causada por *Pythium ultimum*

Este hecho es un indicativo de que la bacteria presenta determinadas propiedades antagonistas contra *P. ultimum* BRSA-02, según se pudo observar en el ensayo anterior, fue capaz de inhibir el desarrollo del hongo en los días iniciales, posiblemente cuando está en su fase exponencial de crecimiento con una alta actividad. Con *Pseudomonas putida* (aislado F) se obtuvo un efecto similar pero no tan acusado como con *Ochrobactrum* sp. (Figuras 4.13c y 4.14c). El efecto inhibitor/retardador de las bacterias, ocurrió solamente cuando estas se sembraron antes que el hongo (Figuras 4.13b, 4.13c, 4.14b y 4.14c). Por el contrario, cuando el hongo se sembró antes que las bacterias, no existió reducción alguna en su desarrollo. Este hecho, puede deberse probablemente a la imposible colonización de las bacterias en presencia del hongo durante la fase lineal de desarrollo (Figuras 4.13d, 4.13e, 4.13f, 4.13g, 4.14d, 4.14e, 4.14f y 4.14g).

Las hifas de *P. ultimum* BRSA-02 presentaron pocos tabiques en el micelio aéreo. Este micelio estaba formado fundamentalmente por hifas finas (2,5  $\mu\text{m}$ ), no alcanzado un grosor superior a 7,5  $\mu\text{m}$ . Las hifas sumergidas tenían pocos tabiques y eran ligeramente más gruesas que las del micelio aéreo.

Estos parámetros no se cumplieron cuando la siembra de las bacterias se realizó antes que el hongo, tratamiento en el que se detectó un efecto retardador del desarrollo. El grosor de las hifas aéreas fue muy homogéneo (5  $\mu\text{m}$ ). Cuando el hongo creció en presencia de la bacteria *Ochrobactrum* sp. (G), las hifas del micelio sumergido presentaron más tabiques y eran levemente más finas de grosor (5  $\mu\text{m}$ ). *P. putida* (F) produjo cambios similares a los ocasionados por *Ochrobactrum* sp. (G), aunque causó como excepción, determinadas deformaciones en las hifas sumergidas de *P. ultimum* BRSA-02 (datos no presentados).





**Figura 4.14.** Tasa de crecimiento del micelio de *Pythium ultimum* BRSA-02 creciendo en PDA a 26 °C. (a) ausencia de bacterias, (b), (c), (d), (e), (f) y (g) presencia de bacterias aisladas, creciendo en el mismo punto junto al hongo. Desviación estándar (n = 4).

#### 4.3.6. Patogenicidad en escapos de brócoli sanos

Inocular microorganismos potencialmente patógenos a piezas de tejido sanas es una técnica habitualmente utilizada en fitopatología con el objetivo de reproducir los síntomas de una enfermedad para verificar los postulados de Koch.

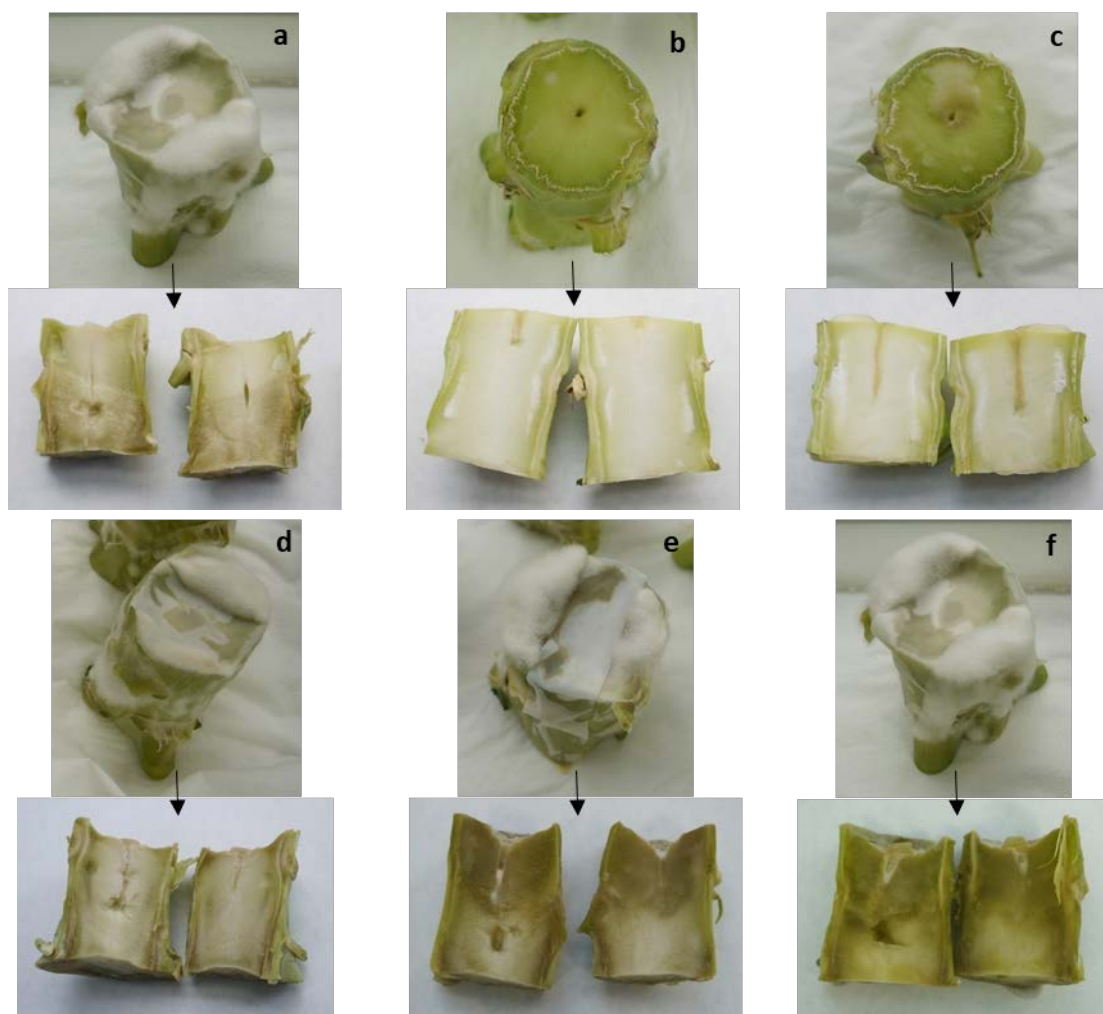
**Tabla 4.2.** Sintomatología desarrollada en las piezas del tallo de brócoli inoculados con *P. ultimum* BRSA-02 y las bacterias *P. putida* (aislado F) y *Ochrobactrum* sp. (aislado G).

Tratamiento	Fragmento	Incidencia	Severidad
<i>Pythium ultimum</i> BRSA-02	a	3	Intermedia
	b	3	Intermedia
	c	3	Alta
	d	3	Baja
	e	3	Intermedia
<i>Ochrobactrum</i> sp. (G)	a	0	-
	b	0	-
	c	0	-
	d	0	-
	e	0	-
<i>Pseudomonas putida</i> (F)	a	1 + 2	-
	b	1 + 2	-
	c	1 + 2	-
	d	1 + 2	-
	e	1 + 2	-
<i>P. ultimum</i> BRSA-02 – <i>Ochrobactrum</i> sp. (G)	a	3	Alta
	b	3	Intermedia
	c	3	Intermedia
	d	3	Intermedia
	e	3	Intermedia
<i>P. ultimum</i> BRSA-02 – <i>P. putida</i> (F)	a	4	Alta
	b	4	Intermedia
	c	4	Intermedia
	d	4	Intermedia
	e	4	Intermedia
<i>P. ultimum</i> BRSA-02 – [ <i>Ochrobactrum</i> sp. (G) – <i>P. putida</i> (F)]	a	4	Alta
	b	4	Alta
	c	4	Intermedia
	d	4	Intermedia
	e	4	Intermedia
Control	a	0	-
	b	0	-
	c	0	-
	d	0	-
	e	0	-

*Nota.* Grados de incidencia de los síntomas observados de la enfermedad en las piezas del tallo de brócoli. 0: asintomático. 1: síntoma atípico por coloración anormal. 2: síntoma típico por hipertrofia. 3: síntoma típico leve. 4: síntoma típico medio.

La inoculación en fragmentos de vegetales supone una ayuda fundamental en la emisión de diagnósticos. Aun si ser una verdadera prueba de patogénesis, se emplea

frecuentemente porque el fragmento vegetal se comporta como un medio de cultivo óptimo para el desarrollo del patógeno, siendo una técnica efectiva para su aislamiento indirecto. Los saprófitos producirían síntomas atípicos o no producirían síntomas (Andrés-Yeves *et al.*, 1991).



**Figura 4.15.** Resultados de la inoculación de los microorganismos aislados a piezas de tallos de brócoli sanos, tras 10 días a 18 °C y 94% HR. (a) fragmento inoculado con *P. ultimum* BRSA-02, (b) *Ochrobactrum* sp., (c) *P. putida*, (d) *P. ultimum* BRSA-02 + *Ochrobactrum* sp., (e) *P. ultimum* BRSA-02 + *P. putida* y (f) *P. ultimum* BRSA-02 + *Ochrobactrum* sp. + *P. putida*.

La prueba de inoculación a piezas de tejido reprodujo los síntomas de la enfermedad en todos los casos en los que se inoculó *P. ultimum* BRSA-02, mientras que las piezas del tratamiento control no desarrollaron síntomas (Figura 4.1a). Los fragmentos inoculados mostraron síntomas 10 días después de ser inoculados. La severidad dependió de la interacción con las bacterias inoculadas. La inoculación del hongo indujo síntomas de incidencia leves de la enfermedad (Tabla 4.2; Figura 4.15a). La inoculación de la bacteria *Ochrobactrum* sp. (aislado G) dio como resultado una sintomatología similar a la del

hongo exclusivamente (Figura 4.15d), pero con mayor grado de incidencia. La exclusiva inoculación de *Pseudomonas putida* (aislado F), fue capaz de desarrollar síntomas por hipertrofia en todos los fragmentos (Figura 4.15c). Sin embargo, cuando el hongo se inoculó con *P. putida* (F) o con ambas bacterias, los síntomas típicos se acrecentaron, es decir, su interacción con esta bacteria acentuó los síntomas de la enfermedad (Tabla 4.2; Figuras 4.15e y 4.15f).

Las muestras se observaron al microscopio para comprobar signos de los microorganismos inoculados. En las situaciones en las que se inocularon las bacterias, estas se observaron en la mayoría de los casos en el tejido de la médula en unión con el punto de inoculación (en el 60% de las piezas inoculadas con *Ochrobactrum* sp. y en el 80% de las inoculadas con *P. putida*). En las piezas en las que se inoculó el hongo junto a las bacterias, estas no se pudieron detectar en ningún fragmento; tampoco se pudieron visualizar bajo el microscopio. El hongo que creció en las piezas de tejidos infectados se identificó nuevamente como *P. ultimum* BRSA-02.

El siguiente paso sería reproducir la sintomatología en plantas enteras de brócoli, pero hasta ahora, no ha sido posible porque parece ser que muchos factores estarían implicados en el desarrollo de esta enfermedad. Se han realizado varios estudios encaminados a este fin, pero sin éxito hasta la fecha. Por lo tanto, creemos que algunos factores críticos pueden verse influidos en el desarrollo de la misma.

#### **4.4. Discusión**

A partir de la observación directa de los tallos florales dañados por los síntomas definidos, se pudo observar la existencia de hifas fúngicas no septadas e hifas con algunos septos (Figura 4.3b). Inicialmente, se sospechó que podría ser una podredumbre blanda acuosa causada por bacterias o especies de *Sclerotinia*, como *S. sclerotiorum*, que causa ese tipo de podredumbre. Aunque las hifas observadas al microscopio tenían algunos septos crecidos en PDA (Figura 4.3), revelaron un micelio aéreo suelto y blanquecino en el que nunca se formaron esclerocios.

Cabe destacar que esta pudrición fúngica también se puede confundir con los síntomas de otra enfermedad, como la enfermedad denominada marchitez por *Verticillium*

provocada, por la especie fúngica *Verticillium dahliae*, que produce un pardeamiento vascular similar en el anillo vascular. Sin embargo, en la enfermedad descrita, el tejido interno se descompuso en un tono grisáceo hacia marrón y en estadios más avanzados (Figura 4.2c), presentó síntomas identificados como podredumbre blanda, que no es producida por *V. dahliae*.

Tras examinar todos los síntomas detallados se pudo descartar que el hongo visualizado y cultivado, tanto en el tejido en descomposición como en el adyacente, perteneciera a los géneros de nuestra hipótesis inicial siendo una especie de *Pythium*, probablemente la especie común *P. ultimum* la responsable de este daño.

Según la morfología, esta especie se puede distinguir por la presencia de anteridios monoclinos con forma de saco, oosporas de pared gruesa e hinchamientos de las hifas. De hecho, aunque la taxonomía de las especies de *Pythium* se basa generalmente en características morfológicas (Van der Plaats-Niterink, 1981), los miembros de *Pythium* se consideran un grupo muy difícil para la delimitación e identificación de especies porque estas características a menudo son muy similares entre diferentes especies y a veces no se forman en la mayoría de los medios de cultivo. Por tanto, se han utilizado métodos moleculares identificativos para complementar la taxonomía morfológica de las especies del género *Pythium* (Uzuhashi *et al.*, 2010). La región ITS se ha utilizado comúnmente para identificar y clasificar especies de *Pythium* porque son muy diferentes entre las especies de este género. Sin embargo, también se han utilizado otros datos moleculares para el análisis filogenético de *Pythium* y géneros relacionados, basados en la subunidad grande de ADNr (LSU) D1/D2 e ITS,  $\beta$ -tubulina o el gen mitocondrial citocromo oxidasa II (coxII) (Uzuhashi *et al.*, 2010). Todos estos análisis genéticos han contribuido a establecer diferentes líneas filogenéticas dentro del género y *P. ultimum* pertenece al conglomerado 4 donde se define un nuevo género (*Globisporangium*) (Uzuhashi *et al.*, 2010). Si la comunidad lo acepta, *P. ultimum* pasaría a llamarse *Globisporangium ultimum*. De hecho, Uzuhashi *et al.* (2019), confirmaron una nueva clasificación del género *Globisporangium*. Cada conglomerado definido por los autores se caracterizó por una morfología esporangial con formas globosas, ovoides, alargadas o filamentosas. Por tanto, basándose en la filogenia y la morfología, estos autores

#### 4. La necrosis del escapo floral de brócoli causada por *Pythium ultimum*

modificaron el género *Pythium* (s. str.) y distinguieron cuatro nuevos géneros; *Ovatisporangium*, *Globisporangium*, *Elongisporangium* y *Pilasporangium*.

Basado exclusivamente en características morfológicas, Van der Plaats-Niterink (1981) distinguió dos variedades morfológicas dentro de esta especie: *P. ultimum* var. *ultimum* y *P. ultimum* var. *sporangiiferum* que tienen secuencias ITS indistinguibles (Schroeder et al., 2013), pero son especies filogenéticamente distintas (Eggertson, 2012). Los esporangios y zoosporas rara vez son producidos por *P. ultimum* var. *ultimum*, pero sí abundantemente por *P. ultimum* var. *sporangiiferum*. Si están presentes, germinan directamente porque las zoosporas no se forman comúnmente en esta especie (Zitter et al., 1998). *Pythium ultimum* var. *ultimum* forma hinchamientos de hifas similares a esporangios que germinan para producir hifas infecciosas y oosporas. Sin embargo, esta variedad rara vez produce esporangios, mientras que *P. ultimum* var. *sporangiiferum*, forma con frecuencia esporangios y zoosporas que no pudimos observar a pesar de todos los medios de cultivo y condiciones de incubación ensayadas. Estos esporangios pueden ser intercalares y terminales, subgloboso el primero y globoso el último. Según las estructuras morfológicas observadas en este trabajo, nuestro aislado BRSA-02 corresponde a *P. ultimum* var. *ultimum*. Aunque el análisis ITS mostró un 100% de similitud con esta variedad, es conocido que no es posible establecer diferencias entre las dos variedades mediante el análisis ITS.

El análisis ITS confirmó que BRSA-02 podría identificarse como *Pythium ultimum* var. *ultimum* sin. *Globisporangium ultimum* (Figura 4.6). Sin embargo, el análisis ITS no pudo separar *P. ultimum* var. *ultimum* de *P. ultimum* var. *sporangiiferum*. Por tanto, establecimos la identificación a partir del análisis fenotípico.

*Pythium ultimum* var. *ultimum* es la variedad más común y patógena, que produce oogonios, pero rara vez esporangios y zoosporas, mientras que la var. *sporangiiferum* es claramente menos común, pero produce zoosporas fácilmente a temperatura ambiente y tiene una temperatura cardinal máxima ligeramente más alta (Drechsler, 1960; Van der Plaats-Niterink, 1981). *P. ultimum* es una de las especies de *Pythium* más comunes en el suelo. Es cosmopolita y se encuentra en climas más fríos a moderadamente cálidos. Generalmente, las temperaturas por debajo de los 20 °C, las condiciones de humedad y

las enmiendas orgánicas mejoran el crecimiento y la germinación de *P. ultimum* en el suelo.

Cuando se describió por primera vez *Pythium ultimum*, se pensó que la pérdida completa de esporangios y producción de zoosporas observada por Trow era una indicación de que esta especie había pasado por completo a vivir en un ambiente terrestre. Por tanto, *Pythium ultimum* se consideró la especie última o final, en una progresión gradual que se había observado en especies ya descritas en el género, que se habían adaptado a la vida terrestre por la pérdida completa de estructuras diseñadas para un medio acuático ancestral (Trow, 1901; citado por Eggertson, 2012).

La presencia de bacterias creciendo junto al hongo nos obligó a estudiar las implicaciones parasitarias entre los microorganismos que se aislaron. En un primer momento, esta presencia creó cierta confusión en relación con el microorganismo que era responsable de la sintomatología sometida a estudio. Sin embargo, las dos bacterias que se aislaron, en el tejido colindante al tejido macerado, no fueron fitopatógenas (*Pseudomonas putida* y una bacteria del género *Ochrobactrum*). Consideramos entonces, que esta descomposición interna del escapo floral del brócoli estaba provocada por el hongo y las bacterias jugarían un papel de tipo antagonista o sinérgico en el proceso de colonización de los tejidos por parte de *P. ultimum* BRSA-02. Posteriormente, los tejidos macerados muertos, al estar desprovistos de defensas, serían colonizados por bacterias pectinolíticas en combinación con el hongo.

*P. putida* es una bacteria que pertenece al grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes y no se ha descrito ninguno de sus biovares con actividad fitopatógena (Holt *et al.*, 1994). En general, tiene un alto potencial degradativo de compuestos orgánicos y aromáticos, junto a una gran capacidad de colonización de los sistemas radiculares de las plantas, creando biopelículas. Esta especie bacteriana desempeñan un papel relevante en la degradación de los restos vegetales del suelo, asociándose frecuentemente a la rizosfera de las plantas. Algunas cepas presentan propiedades promotoras en el crecimiento y desarrollo vegetativo (Bailly y Weisskopf, 2012) y otras son capaces de producir compuestos antimicrobianos con actividad fungicida, bactericida y nematocida (Sheoran *et al.*, 2015; Agisha *et al.*, 2019). A nivel fúngico, se ha utilizado, obteniendo muy buenos resultados en el control de *Fusarium oxysporum* (Validov *et al.*, 2007), *Phytophthora*

#### 4. La necrosis del escapo floral de brócoli causada por *Pythium ultimum*

*capsici* (Aravind *et al.*, 2009) y recientemente contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Archana *et al.*, 2021), entre otros.

Al no haberse descrito ninguna cepa de esta bacteria como fitopatógena, consideramos que su presencia fue casual o quizás, puede que se encontrara junto a *Pythium ultimum* BRSA-02 durante la colonización de los tejidos. Su penetración en el tejido tuvo lugar a través de alguna abertura ocasionada por un agente físico o través de algún mecanismo de penetración específico en el tejido intacto.

En relación con *Ochrobactrum* sp., comentar que pertenece a las proteobacterias y se ha informado de varios nichos ecológicos en plantas (Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2007), animales (Kämpfer *et al.*, 2003) y también en humanos (Teyssier *et al.*, 2007). Los aislados ambientales de *Ochrobactrum* sp. generalmente se asocian a las plantas, porque en la mayoría han sido aislados de la rizosfera y del rizoplano (Lebuhn *et al.*, 2000). Algunas cepas de esta bacteria, tales como *Ochrobactrum haematophyllum* es capaz de degradar plaguicidas, producir sustancias antifúngicas y actuar como promotora en el crecimiento de vegetales (Zhao *et al.*, 2012). Con actividad biofungicida en el control de las enfermedades de las plantas destaca *Ochrobactrum anthropi* contra *Fusarium oxysporum* y *Exobasidium vexans* (Chaiharn *et al.*, 2009; Sowndhararajan *et al.*, 2012) y *Ochrobactrum ciceri* contra *Botrytis cinerea* y *Macrophomina phaseolina* (Priyanka y Nakkeeran, 2019; Shoaib *et al.*, 2020). Consideramos que el microorganismo que se detectó, sin haber podido identificarse completamente a nivel de especie mediante una PCR, puede que se corresponda con cualquier de las especies citadas que presentan una actividad antifúngica, dada la interacción positiva que se produjo contra *Pythium ultimum* BRSA-02. Probablemente, la vía de entrada a la planta tuvo lugar al mismo tiempo que *Pseudomonas putida*, durante el proceso de colonización e infección del tejido por parte del hongo. Lo que queda claro es que, dadas las características de ambas especies bacterianas, ninguna trataba de favorecer el desarrollo de la enfermedad, sino todo lo contrario.

Se esperaba que los resultados de los experimentos que se realizaron *in vitro* con el objetivo de comprobar la sinergia o antagonismo, entre el hongo y las bacterias, confirmasen una compatibilidad entre las tres especies, ya que estas fueron aisladas en la misma área. Estos resultados, indicaron que las propiedades antagonistas eran más



claras en *Ochrobactrum* sp. que en *P. putida*. Al confrontar ambas especies ante *P. ultimum* BRSA-02, se pudo medir el efecto ralentizador en el desarrollo micelial del hongo.

El aislado de *Ochrobactrum* sp. tiene una mayor capacidad de generar sustancias difusibles tóxicas contra *P. ultimum* BRSA-02 en el medio de cultivo. Varias especies del género *Ochrobactrum*, además del efecto antifúngico, pudieron solubilizar fosfato, producir sideróforos o sustancias que se emplean en la producción del hierro y generar ácido indolacético (AIA) (Zouari *et al.*, 2020), tal es el caso de la cepa TRS-2 aislada de la rizosfera de plantas de té (Chakraborty *et al.*, 2009). Las propiedades antifúngicas que indican los autores que han sido anteriormente citados y la capacidad de producir sideróforos de esta bacteria, hemos podido apreciarlo en nuestros resultados, al comprobar el efecto antagonista que nuestro aislado mostró contra *P. ultimum* BRSA-02, en ambos medios de cultivo, PDA y PCA. Probablemente como el tejido del brócoli tiene una alta cantidad de hierro, la producción de sideróforos parte de la bacteria se ve inhibida, siendo capaz de desarrollarse junto a *P. ultimum* BRSA-02. Al haber utilizado para los ensayos medios pobres en hierro, a base de extracto de levaduras (PCA) y patata (PDA), la producción de sideróforos por parte de la bacteria se pudo ver estimulada, siendo un factor importante en la detección del desarrollo del hongo. Se debe de tener en cuenta que el efecto antifúngico de la cepa *O. anthropi* TRS-2 se debió a la presencia de varios mecanismos de acción (Chakraborty *et al.*, 2009).

Por otro lado, antes de comentar la interacción entre *Pythium ultimum* BRSA-02 y *Pseudomonas putida*, es importante considerar que existen cepas de este aislado bacteriano, tales como la BP25, que son capaces de producir compuestos orgánicos volátiles, concretamente derivados de la pirazina que tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro contra diversos microorganismos, entre los que se incluyen los hongos (Sheoran *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2021). La actividad antifúngica de los compuestos orgánicos volátiles es debida a la supresión directa del crecimiento micelial, esporulación y morfogénesis de los hongos, lo que conlleva a una reducción en la carga de población del patógeno, desencadenando una respuesta defensiva en el huésped (Patel *et al.*, 2021). Los investigadores Ashajyothi *et al.*, 2019, comentaron en su trabajo que los compuestos volátiles emitidos por *Pseudomonas putida* BP25, desencadenaron

#### 4. La necrosis del escapo floral de brócoli causada por *Pythium ultimum*

la expresión de genes de defensa en arroz contra *Magnaporthe oryzae*. Nuestros resultados coinciden con estos hallazgos, especialmente en lo relacionado con el retardo en desarrollo de *Pythium ultimum* BRSA-02 cuando se confrontó *in vitro* ante nuestro aislado de *P. putida*. Este efecto también se pudo ver en los cambios de las estructuras de las hifas y posiblemente se deba a la emisión de algún compuesto volátil con actividad antimicrobiana por parte del aislado bacteriano. Coincidimos con Archana *et al.*, 2021 en relación a la actividad fugistática de *P. putida*, puesto que es una bacteria capaz de paralizar o suspender de forma puntal el desarrollo del hongo, pero sin alcanzar su muerte, no pudiéndose considerar un fungicida como tal.

En el ensayo en el que ambas bacterias crecieron conjuntamente *in vitro* con el hongo, habiendo sido sembradas antes que *P. ultimum* BRSA-02, estas consiguieron retardar drásticamente el desarrollo del hongo en los primeros días, pero posteriormente recuperó su tasa normal de crecimiento. Sin embargo, cuando el hongo es sembrado antes que las bacterias, el desarrollo del mismo prácticamente no se ve afectado. Esto sugiere que ante una competencia por nutrientes o espacio el mayor beneficiado es *P. ultimum* BRSA-02.

*P. ultimum* BRSA-2 fue el único organismo que se aisló tanto en el tejido macerado como en el frente de avance de la podredumbre; este hecho constituye un claro indicio de que el agente causal es el hongo. Además, se reprodujeron síntomas leves y medios cuando el hongo fue sembrado en todas las piezas del tallo de brócoli. En los fragmentos en los que no fue inoculado *P. ultimum* BRSA-02 se produjeron síntomas atípicos, como hipertrofia del tejido vegetal próximo al punto de inoculación causado por *P. putida*. Este síntoma pudo deberse a la síntesis de sustancias promotoras del crecimiento y desarrollo vegetativo por parte de la bacteria, ya que se ha demostrado que es capaz de producir ácido indolacético (AIA), hormona vegetal que estimula el crecimiento (Gravel *et al.*, 2007). Cuando *P. putida* creció conjuntamente con *P. ultimum* BRSA-02 y *Ochrobactrum* sp. la síntesis de esta hormona pudo quedarse bloqueada. También es destacable el efecto sinérgico de *P. ultimum* BRSA-02 y *P. putida* cuando fueron inoculados a las piezas del tallo de brócoli, puesto que la sintomatología fue más severa que cuando solo se inoculó al hongo. Resulta difícil interpretar este resultado, porque *in vitro*, *P. putida* tenía un efecto retardador en el desarrollo del hongo. Sin embargo, la

incidencia y severidad de los síntomas, medidos en relación con la descomposición y coloración del tejido, no debe ser un indicativo de un avance mayor de la podredumbre; considérese que el interior de los tallos estaban afectados en todos los casos en los que el hongo fue inoculado.

La identificación del agente causal de la pudrición blanda es un proceso prioritario para evitar y combatir las pérdidas que se producirían tanto en el campo como durante la comercialización de frutas y hortalizas. Por esta razón, es importante determinar si el patógeno primario es un hongo o una bacteria, especialmente cuando la pudrición sometida a estudio se ha asociado inicialmente con un patógeno bacteriano y se desconoce la participación del hongo *P. ultimum* BRSA-02 en ella. Los síntomas descritos en este trabajo, no se asemejan a la descripción que Kubota *et al.* (1995) hicieron sobre la pudrición del tallo del brócoli, que la definieron como de consistencia acuosa con una superficie blanquecina debido al desarrollo del micelio. No existen datos sobre la incidencia de esta sintomatología, quizás porque se asocia, como hemos dicho anteriormente, a una pudrición blanda bacteriana. Tampoco hay datos de pudrición bacteriana desarrollada en las pellas durante el cultivo. En cualquier caso, nuestra experiencia sitúa a esta sintomatología como de incidencia ocasional, pero probablemente no infrecuente, ya que puede pasar desapercibida durante el cultivo. Solo se puede ver en el momento de la cosecha, si el desarrollo es alto.

El método de detección de *Pythium ultimum* propuesto por Shen *et al.* (2017) mediante amplificación isotérmica, puede ser eficaz y rápido para que se consideren debidamente las normativas fitosanitarias, que eviten un tratamiento de control incorrecto. El problema de esta podredumbre es que, en la mayoría de los casos, no presenta signos externos que nos permitan identificar que la planta está siendo parasitada, hay que cortar la cabeza del vegetal para realizar la identificación. Sería interesante desarrollar una tecnología que nos permita reconocer las plantas afectadas sin necesidad de cortar las inflorescencias.

Esta sintomatología ya no se ha vuelto a observar después de su descubrimiento en 2013. Por tanto, parece ser una enfermedad de baja incidencia que depende de una combinación específica de condiciones culturales y ambientales. Sin embargo, su incidencia se vería incrementada en el futuro debido al calentamiento global. De hecho,

la caracterización del factor crítico que afecta al desarrollo de esta enfermedad debería de ser una tarea importante a tener en cuenta.

#### **4.5. Conclusiones**

*Pythium ultimum* BRSA-02 ha desarrollado síntomas leves y medios de la enfermedad en piezas vegetales de brócoli. Las bacterias ensayadas no han podido desarrollar tales síntomas. Este resultado sugiere que el causante de la enfermedad o sintomatología descrita es el hongo.

Las bacterias que se aislaron en el frente de avance de la podredumbre no causan la enfermedad, pero cuando crecen *in vitro* con el hongo interfieren en su desarrollo. *Ochrobactrum* sp. pudo reducir el desarrollo de *P. ultimum* BRSA-02 a través de varios mecanismos, por la producción de sustancias que impiden el desarrollo del mismo y por la competencia directa de nutrientes o espacio.

La interacción de *Pseudomonas putida* con *P. ultimum* BRSA-02 fue menor que con *Ochrobactrum* sp. en relación con el desarrollo del hongo. Sin embargo, cuando *P. putida* fue inoculada junto a *P. ultimum* BRSA-02 en piezas vegetales de brócoli los síntomas se agravaron, siendo esta combinación la más agresiva.

Las especies bacterianas aisladas del tejido macerado de las piezas afectadas, entre las que se incluyen dos especies pectinolíticas, tenían que ser especies saprófitas que penetraron en el tejido por la vía infectiva, desarrollándose en el tejido macerado ya muerto. Por el contrario, las especies *Ochrobactrum* sp. y *P. putida* crecieron junto con *P. ultimum* BRSA-02 en el frente de avance de la podredumbre, zona en la que no se detectaron especies bacterianas pectinolíticas.



## CAPÍTULO 5

---

# Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de *Fusarium*

### 5.1. Introducción

El melón (*Cucumis melo* L.) es conocido a nivel mundial por sus propiedades nutritivas, siendo rico en ácido ascórbico, carotenos, flavonoides, minerales y otros compuestos bioactivos de vital importancia para la salud humana (Parle y Singh, 2011).

Es un producto comúnmente cultivado en el sudeste de España. La producción total durante 2018 fue de 664.353 toneladas a nivel estatal. La Región de Murcia es el área más productora de esta fruta con 220.768 toneladas, destinando 5.576 ha para su cultivo (MAPAMA, 2018).

La escasa rotación de cultivos y el aumento de la superficie dirigida a la producción, ha elevado la incidencia de enfermedades causadas por hongos del suelo durante el cultivo de este vegetal, hecho que afecta de forma significativa a la calidad de los frutos (Medeiros Araújo *et al.*, 2021).

Los microorganismos que infectan al fruto de melón aprovechan como vía de penetración los daños mecánicos y ocasionan importantes pérdidas durante el periodo poscosecha. Cuando la fruta tiene como destino el mercado exterior, las pérdidas pueden alcanzar en torno al 15% (Lima *et al.*, 2021). Además, los síntomas solo serán visibles tras el periodo de transporte, una vez que la fruta llega al país receptor, aunque la infección se haya producido en los frutos jóvenes, durante el cultivo, y el patógeno permanezca inactivo hasta el almacenamiento, momento en el que se iniciará un avance progresivo de las lesiones (Wang *et al.*, 2014).

Las especies de *Fusarium* son los patógenos más importantes en las cucurbitáceas, causando podredumbre en frutos, tallos y raíces (Chehri *et al.*, 2011). Se ha informado ampliamente de varias especies de *Fusarium* que causan la podredumbre de los frutos: *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. pallidoroseum* sin. *F. semisectum* (Cooke) Sacc., *F. solani* (Mart.) Sacc., (Snowdon, 1991); *F. graminum* Ces., *F. acuminatum* Ellis & Everh., *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *F. moniliforme* J. Sheld., *F. pallidoroseum* sin. *F. incarnatum* (Roberge) Saccardo, *F. scirpi* sin. *F. longipes* Wollenweber & Reinking, *F. oxysporum* f. sp. *melonis* Snyder & Hansen (Zitter *et al.*, 1998); *F. graminearum* Schwabe, *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg y *F. roseum* sin. *F. sambucinum* Fuckel (Kim y Kim, 2014).

Además de *Fusarium* sp., destacan otros géneros fúngicos que causan diferentes patologías en raíces, tallos y frutos durante el cultivo y el periodo poscosecha del melón; tales como *Alternaria* sp. (Kobayashi *et al.*, 2004), *Rhizopus* sp. (Kwon *et al.*, 2010), *Phytophthora* sp. (Herrero *et al.*, 2002), *Penicillium* sp. (Pornsuriya y Chitphithak, 2018; Ning *et al.*, 2019) y *Stagonosporopsis* sp. (Ruangwong *et al.*, 2021). Algunas de estas patologías se conocen desde hace más de un siglo, mientras que otras, han sido descritas en la actualidad.

En cuanto a las especies de *Fusarium* que afectan a las cucurbitáceas cultivadas en España, han cobrado especial relevancia las siguientes especies del género: *Fusarium oxysporum* (Martínez *et al.*, 2003b) y *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* Snyder & Hansen; varios estudios en sandía injertada en calabaza (Armengol *et al.*, 2000), calabacín (Gómez *et al.*, 2008) y melón (Gómez *et al.*, 2014) avalan este hecho.

En las podredumbres de los frutos destacan *F. oxysporum* y *F. solani*, aunque también se ha citado *F. sambucinum* (Kim y Kim, 2014). No obstante, tenemos constancia de que en muchos estudios solamente se citan las podredumbres fusáricas causadas por *Fusarium* sp., sin especificar la especie en concreto, por lo que se pierde bastante información a nivel de diagnóstico. En este sentido, aumentar nuestro conocimiento sobre la diversidad de especies que causan la podredumbre de melón permite que se haga un diagnóstico preciso del agente causal, proponiendo prácticas de gestión y métodos de control más precisos.

*Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* ha sido recientemente renombrado como

## 5. Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de *Fusarium*

*Neocosmospora cucurbitae* (Sandoval-Denis *et al.*, 2019), aunque algunos autores como O'Donnell *et al.* (2020), se oponen a esta nueva taxonomía, argumentando que puede crear confusiones y efectos negativos para la microbiología médica, ya que se ignoraría una información crucial sino se identifica como *Fusarium* sp.

De no ser así, el complejo de especies de *F. solani* quedaría designado como FSSC incluido dentro del género *Neocosmospora* (Lombard *et al.*, 2015). En él encontramos un grupo muy heterogéneo de especies morfológicamente similares, con distintas preferencias de hospedadores, entre los que se incluyen las plantas y los humanos (González *et al.*, 2020a). Se dan tres conglomerados principales que abarcan más de 60 especies filogenéticas y en el conglomerado 3 es donde aparecen los aislados fitopatógenos relacionados con las enfermedades de plantas (Zhang *et al.*, 2006; O'Donnell *et al.*, 2008; Coleman, 2016; Pérez-Hernández *et al.*, 2020). En España, recientemente se han documentado las especies *Neocosmospora keratoplastica* (González *et al.*, 2020a) y *Neocosmospora falciformis* (González *et al.*, 2020b) causando marchitez y pudrición en las raíces de melón.

Los estudios más recientes publicados indican que en el linaje filogenético de *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) hay especies fitopatógenas que atacan de forma natural a los frutos de melón durante el periodo poscosecha. Autores como Li *et al.* (2019) y Nuangmek *et al.* (2019) aislaron a *Fusarium equiseti* causando enfermedad en melón cantalupo. En ambos casos, la podredumbre provocó ablandamiento y cambios en coloración de la superficie de los frutos. Por otro lado, Wonglom y Sunpapao (2020) identificaron a *Fusarium incarnatum* en Tailandia, también en melón. Esta especie ocasionó una podredumbre en la fruta enferma sobre la que indicaban que se desarrolló un micelio de tipo algodonoso y el tejido interno del fruto tomó un color marrón oscuro. Perteneciente al mismo complejo de especies, Oliveira *et al.* (2014) estudiaron determinados factores que afectaban a la podredumbre seca corchosa originada por *Fusarium semitectum* en frutos de melón.

Por último, del complejo de especies *Fusarium fujikuroi* (FFSC), se detectó por primera vez en México, a la especie *Fusarium proliferatum* causando enfermedad en *Cucumis melo* var. *reticulatus* (Rivas-García *et al.*, 2018). De acuerdo con Yilmaz *et al.* (2021), algunas secuencias de material tipo identificadas como *F. proliferatum* están siendo



actualmente identificadas como *F. annulatum*. Ambas especies son filogenéticamente diferentes, aunque en el pasado, *F. annulatum* ha sido frecuentemente estudiado como *F. proliferatum*.

No tenemos constancia de estudios previos desarrollados en España sobre la podredumbre poscosecha de la fruta de melón causada por *Fusarium* sp. Es destacable en esta área geográfica, que el desarrollo de hongos fitopatógenos se vea favorecido por las condiciones climáticas de la cuenca mediterránea, hecho que afecta tanto a las plantaciones de melón como a la posterior comercialización de este producto.

El objetivo de este trabajo fue identificar las especies de *Fusarium* que ocasionaron enfermedad en muestras recolectadas de melón. Para ello, se aislaron a los organismos asociados a las sintomatologías, se describieron sus características morfológicas y se identificaron las especies mediante técnicas moleculares. Finalmente, se confirmaron los postulados de Koch y se evaluaron, mediante ensayos de patogenicidad, el porcentaje de infección en frutos sanos inoculados, así como la gravedad de la enfermedad en los mismos.

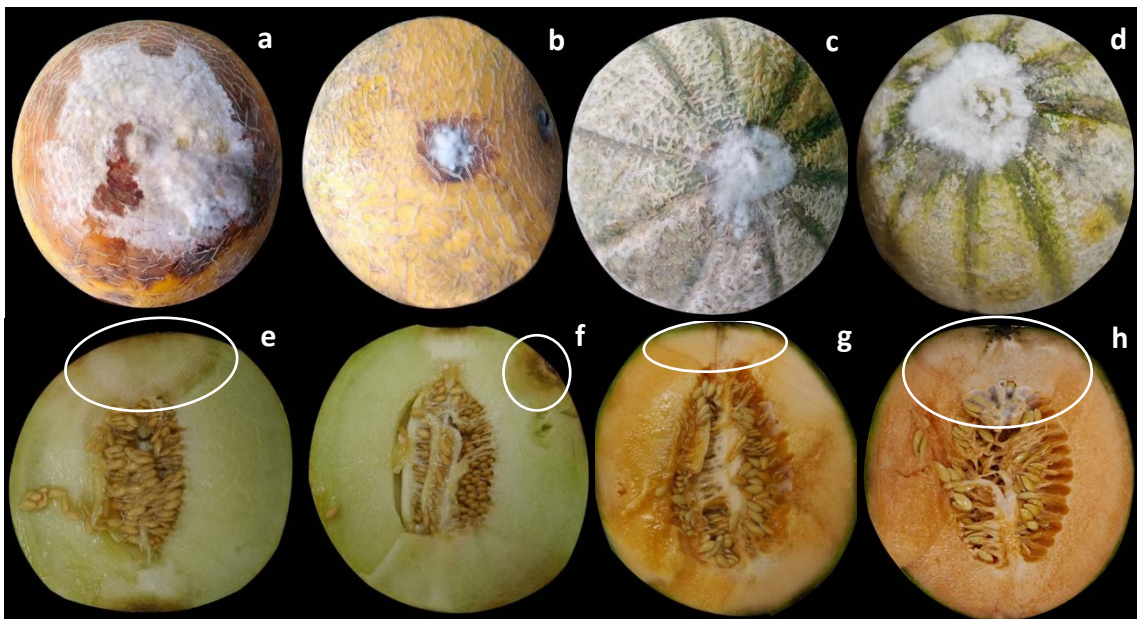
## **5.2. Materiales y métodos**

### **5.2.1. Muestreo y aislamiento de patógenos**

Productores de melón del campo de Cartagena, provincia de Murcia, España (37°36'18.4''N, 0°59'10.4''W), suministraron al Laboratorio de Fitopatología del Grupo de Protección de Cultivos de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), varios especímenes de melón de las variedades comerciales cantalupo y galia con síntomas de podredumbre. Los frutos fueron recolectados durante julio de 2018, procedentes de diferentes zonas productoras de las provincias de Murcia y Castilla la Mancha. La sintomatología de la enfermedad comprendía zonas parduzcas de la piel cubiertas de micelio blanco que crecía en diferentes zonas del epicarpio de los frutos, especialmente en la zona cercana al pedúnculo con una longitud de hasta 12 cm en galia (Figura 5.1a) y 6 cm en cantalupo (Figura 5.1d). Esta masa de micelio estaba rodeada de una epidermis oscurecida y ablandada. También se revelaron lesiones internas en el mesocarpio de una profundidad aproximada de 3 cm en galia (Figura 5.1e) y 4 cm en

## 5. Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de *Fusarium*

cantalupo, donde llegó a alcanzar el tejido placentario desarrollando un micelio laxo (Figura 5.1h). La pulpa del melón perdió consistencia, volviéndose más acuosa como consecuencia de la degradación celular, incluso dando lugar a un pardeamiento interno en la zona próxima a la piel (Figura 5.1f). El aislamiento de los hongos responsables se hizo a través de dos métodos distintos y se aplicó a todas las muestras de frutos (Figura 5.1). Uno directo, transfiriendo el micelio en desarrollo presente en la piel de los frutos a placas Petri que contenían PDA con la adición de 0,1 g/L de estreptomycin. Otro indirecto, que consistió en desinfectar el tejido próximo a la zona afectada siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1 de materiales y métodos generales. Se tomaron fragmentos de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm del tejido infectado de forma aséptica, y se colocaron en PDA. Las placas de cultivo fueron incubadas en oscuridad a una temperatura fija de 26 °C durante 7 días.



**Figura 5.1.** Sintomatología en frutos de galia y cantalupo causada por distintas especies de *Fusarium*. Podredumbre externa-interna: (a-e, b-f) galia y (c-g, d-h) cantalupo.

Tras el periodo de incubación, se transfirieron las puntas de las hifas de las colonias emergentes a nuevas placas de PDA para obtener cultivos puros. Previo al análisis morfológico y molecular de los aislados de *Fusarium* obtenidos, estos fueron agrupados en base a las características fenotípicas, especialmente en lo relacionado con su coloración y textura de las colonias. Se obtuvieron 12 aislados de los que 4 de ellos tenían características macroscópicas similares; se utilizaron los aislados MLFR-01, MLFR-03, MLFR-07 y MLFR-09 como aislados representativos de este estudio.

### **5.2.2. Observación y caracterización morfológica**

Se transfirieron fragmentos de micelio en crecimiento activo de 5 x 5 mm de cada uno de los 4 aislados, que habían crecido durante 5 días, al centro de una placa de PDA (4 repeticiones). Las placas fueron incubadas en oscuridad a 26 °C para evaluar el desarrollo de las colonias. Para permitir el desarrollo de determinadas características microscópicas, las colonias fueron cultivadas en agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) (Leslie y Summerell, 2006), que es un medio de cultivo sintético bajo en nutrientes, incubándolas bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad. Los datos de crecimiento micelial se tomaron con un calibre en base a los dos ejes perpendiculares del diámetro de la colonia, tras 4 días de incubación en PDA y 6 días en SNA. El color de la colonia se evaluó después de 14 días de crecimiento. Tras 10 días de incubación en ambos medios, se prepararon muestras para su observación al microscopio. La evaluación de los aislamientos se llevó a cabo en base a las características propias de cada especie, considerando la presencia de conidióforos, conidios en el micelio aéreo, células conidiógenas, producción de esporodoquios y clamidosporas. Se registró el promedio de los valores máximos y mínimos para cada estructura identificada (n = 30). Los equipos de imagen utilizados para este análisis quedan especificados en el apartado 3.2.2 de materiales y métodos generales.

### **5.2.3. Identificación molecular**

Los aislados MLFR-01, MLFR-03, MLFR-07 y MLFR-09 se cultivaron durante 3 días en PDA a 26 °C para confirmar, a nivel molecular, las especies fúngicas que causaban podredumbre en los frutos de melón. Se utilizó la PCR como método molecular para amplificar el ADN de las regiones del gen del espaciador transcrito interno (ITS) tal y como se describe en el apartado 3.3.2.1 de materiales y métodos generales, utilizando tres repeticiones de cada uno de los 4 aislados. Para confirmar la identidad del aislado MLFR-09, se analizó el gen TEF1- $\alpha$  (sección 3.3.2.2 materiales y métodos generales).

### **5.2.4. Ensayos de patogenicidad y evaluación de la severidad de las enfermedades**

Para la prueba de patogenicidad se utilizaron frutos sanos de las variedades galía y cantalupo en etapa de madurez fisiológica (10 días después de la recolección,  $\geq 10$  °Brix),

## 5. Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de *Fusarium*

con un diámetro entre 16 y 20 cm y un peso aproximado de 1-1,5 kg. Para MLFR-01 y MLFR-03 la prueba se hizo en galia, porque estos patógenos habían sido aislados en dicha variedad comercial, mientras que para MLFR-07 y MLFR-09 se hizo por la misma razón en cantalupo. Primero los aislados se cultivaron durante 7 días en PDA a 26 °C para permitir su esporulación. Se prepararon suspensiones de conidios de cada aislado según el método descrito por Newmeyer (1990), ajustando la concentración a  $1 \times 10^6$  conidios/mL en agua destilada estéril. Los frutos se estilizaron en superficie siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1 de materiales y métodos generales. Un grupo de frutos fueron heridos con una aguja estéril y otro grupo se dejó sin herir. De las suspensiones de conidios, se pipetearon 50  $\mu$ L sobre la herida/superficie de los melones sanos, mientras que el control se inoculó con agua destilada estéril. Se utilizaron diez frutos por tratamiento de inoculación y diez en el tratamiento de control. Los frutos se conservaron a  $28 \pm 2$  °C durante 7 días. La humedad relativa se mantuvo constante cubriéndolos con bolsas de plástico, y la prueba se repitió dos veces. El desarrollo de cualquier síntoma se comprobó y registró diariamente desde el momento de la inoculación. Se determinó el porcentaje de melones que desarrollaron enfermedad. Para poder evaluar la gravedad de cualquier podredumbre en cada melón, se utilizó el índice de severidad de la enfermedad (ISE), de acuerdo con Promwee *et al.* (2017) y siguiendo la escala de clasificación propuesta por Wonglom y Sunpapao (2020). Esta escala asigna diferente puntuación en base a la amplitud de invasión del micelio y a la extensión de la pudrición en la fruta tras la inoculación: 0 = sin infección, 1 = infección con una extensión micelial de 0,5 a 1 cm del punto de inoculación, 2 = extensión micelial de 1 a 2 cm de distancia, 3 = extensión micelial superior a 2 cm de distancia, 4 = extensión micelial superior a 2 cm de distancia combinada con pudrición de la fruta, decoloración de los tejidos bajo el desarrollo del micelio y 5 = extensión micelial superior a 2 cm de distancia combinada con una pudrición de toda la fruta.

$$ISE (\%) = \frac{\Sigma (\text{Puntuación escala frutos})}{\text{Puntuación máxima} \times \text{Número total de frutos}} \times 100$$

Se volvieron a aislar las cuatro especies para comparar su morfología con la de las podredumbres iniciales. Los patógenos se identificaron con métodos moleculares para verificar los postulados de Koch.

### 5.3. Resultados

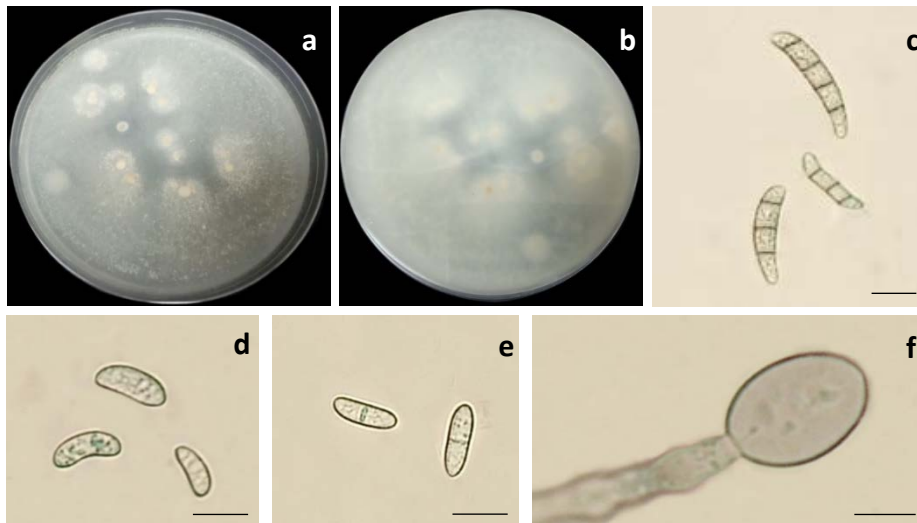
#### 5.3.1. Estudio molecular

Se secuenciaron y compararon las regiones ITS del complejo génico ADNr para comprobar la similitud y diversidad de los aislados de *Fusarium* a nivel genético. Las regiones ITS de las tres repeticiones de cada aislado eran iguales; en efecto, el estudio molecular determinó que eran idénticas y medían 489 pb (MLFR-01), 480 pb (MLFR-03), 469 pb (MLFR-07) y 582 pb (MLFR-09). Dichas secuencias fueron depositadas en el GenBank con diferentes números de acceso para la región ITS. En base a las características moleculares, MLFR-01 (N.º acceso MZ353016) fue identificado como *Fusarium solani*, MLFR-03 (N.º acceso MZ353606) como *Fusarium brachygibbosum*, MLFR-07 (N.º acceso MZ354629) como *Fusarium equiseti* y MLFR-09 (N.º acceso MZ355136) como *Fusarium annulatum*. Además, teniendo en cuenta las recomendaciones de Aktaruzzaman *et al.* (2018), para *F. annulatum* se determinó el gen TEF1- $\alpha$  para poder verificar con éxito la identidad del aislado dado que las especies del complejo de *F. fujikuroi*, poseen copias no ortólogas de ITS2, lo que puede llevar a conclusiones de identificación erróneas. La ampliación por PCR del gen TEF1- $\alpha$  para MLFR-09 proporcionó un fragmento de 709 bases de longitud que fue depositado en el GenBank con el número de acceso OL960473, mostrando un 99,3% de identidad con la secuencia MT010994 de *F. annulatum*. Por otro lado, se llevó a cabo la búsqueda BLAST en GenBank (NCBI) para las secuencias ITS de los 4 aislados siendo 100% idénticas a las siguientes accesiones: MLFR-01 con *Fusarium solani* CBS 140079 (N.º acceso NR\_163531), MLFR-03 con *Fusarium brachygibbosum* DLP41S3a1 (N.º acceso MK757199), MLFR-07 con *Fusarium equiseti* XC01 (N.º acceso MT579854) y MLFR-09 con *Fusarium annulatum* CBS 738.97 (N.º acceso MH862668).

Finalmente, los 4 aislados sometidos a estudio fueron depositados en la colección de cultivos MAPYS y conservados según los métodos que se especifican en el apartado 3.5 de materiales y métodos generales.

### 5.3.2. Características morfológicas de los aislados

A los 4 días de incubación en oscuridad se evaluó el diámetro medio de las colonias crecidas en PDA de todos los aislados. De menor a mayor nivel de desarrollo, tenemos que *Fusarium brachygibbosum* MLFR-03 creció  $75 \pm 5$  mm, *Fusarium equiseti* MLFR-07 alcanzó  $66 \pm 2$  mm, *Fusarium annulatum* MLFR-09 llegó hasta  $54 \pm 5$  mm y en *Fusarium solani* MLFR-01 el crecimiento fue de  $43 \pm 3$  mm. El desarrollo también se valoró en Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) tras 6 días de incubación, bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad. En este caso, los diámetros medios de las colonias fueron similares entre los aislados, siendo de  $85 \pm 2$  mm,  $84 \pm 2$  mm,  $79 \pm 2$  mm y  $74 \pm 3$  mm respectivamente para *Fusarium brachygibbosum* MLFR-03, *Fusarium annulatum* MLFR-09, *Fusarium equiseti* MLFR-07 y *Fusarium solani* MLFR-01. El aislado que presentó un mayor nivel de desarrollo en ambos medios fue *Fusarium brachygibbosum* MLFR-03 y el que menos *Fusarium solani* MLFR-01.



**Figura 5.2.** Características morfológicas de *Fusarium solani* MLFR-01. (a-b) vista superior e inferior de la colonia en PDA tras 10 días a 26 °C, (c) macroconidios, (d-e) microconidios y (f) clamidospora terminal individual. Barra de escala: c = 20  $\mu$ m; d, e = 10  $\mu$ m y f = 5  $\mu$ m.

El micelio fúngico aéreo desarrollado en SNA era escaso, un ligero micelio blanquecino se abría paso por toda la extensión de la placa de cultivo. En PDA se detectó una mayor variabilidad.

**Tabla 5.1.** Características morfológicas del aislado MLFR-01 causante de la podredumbre de la fruta de melón galia y descripciones previas de *Fusarium solani*.

Características morfológicas	<i>Fusarium solani</i>		Aislado MLFR-01
	Leslie y Summerell (2006)	Li <i>et al.</i> (2010)	Este estudio
Colonias en PDA			
Vista superior	Color blanco a crema con escaso micelio	Pigmentación marrón y micelio aéreo escaso	Colonias dispersas en color beige claro con una ligera pigmentación marrón
Vista inferior	ND	Color crema	Color beige más intenso
Macroconidios			
Forma	Ancha, recta y robusta	Cilíndrica, célula apical redondeada y roma, célula basal redondeada	Fusiforme, ancha, curvada; célula apical redondeada y célula basal con forma de pie y apenas muescas
Largo ( $\mu\text{m}$ )	ND	22-63	20-57,5
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	ND	3,2-5,0	3,7-7,5
N.º de septos	5-7	2-6	3-5
Microconidios			
Forma	Ovalada, elipsoide, reniforme y fusiforme	Elipsoide a ovoide	Globosa, fusiforme, ovalada y reniforme
Largo ( $\mu\text{m}$ )	ND	6-14	5-12
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	ND	2,5-3,5	2-3
N.º de septos	0-1 y ocasionalmente 2	ND	0-1
Clamidosporas		Ausente	
Forma	Intercalares o terminales		Intercalares o terminales
Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	ND		7,5-10

Nota. ND: no descrito.

El aislado de *Fusarium solani* MLFR-01 tuvo una disposición de las colonias de forma dispersa, los márgenes eran ondulados de color beige claro, con una ligera pigmentación marrón (Figura 5.2a). El reverso era de un color beige más intenso (Figura 5.2b). La esporulación era abundante, aunque el micelio aéreo fue escaso, casi inexistente. La formación de esporodoquios fue frecuente en PDA, se apreciaron determinados puntos de esporodoquios en color crema. Las hifas hialinas presentaron septos y ramificaciones, la anchura no fue superior a 5  $\mu\text{m}$ . Las células conidiógenas eran monofiálides de tamaño medio. Los macroconidios eran fusiformes, anchos, curvados, en su mayoría de 3 a 5 septos, de 20-57,5 x 3,7-7,5  $\mu\text{m}$ ; células apicales redondeadas y células basales con forma de pie y apenas muescas (Figura 5.2c). Se produjo una elevada cantidad de microconidios globosos, fusiformes, ovalados y reniformes; frecuentemente sin septos y ocasionalmente con uno, de 5 a 12 x 2 a 3  $\mu\text{m}$  (Figura 5.2d y 5.2e). La producción de clamidosporas se observó en SNA, tanto intercales en cadenas cortas como terminales individuales con un tamaño que oscilaba entre 7,5-10  $\mu\text{m}$  (Figura 5.2f).

## 5. Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de *Fusarium*

De acuerdo con las características morfológicas, el aislado MLFR-01 se identificó como *Fusarium solani*. Se compararon también sus particularidades morfológicas con otras especies próximas de *Fusarium solani*, tal y como figura en la tabla 5.1.



**Figura 5.3.** Características morfológicas de *Fusarium brachygibbosum* MLFR-03. (a-b) vista superior e inferior de la colonia en PDA tras 10 días a 26 °C, (c) microconidios, (d) macroconidios, (e) clamidospora unicelular terminal, (f) clamidospora intercalar en cadena corta, (g) monofiálides alargadas y (h) polifiálides cortas. Barra de escala: c, d, e, f, g y h = 10  $\mu$ m.

El desarrollo del aislado de *Fusarium brachygibbosum* MLFR-03 en PDA otorgó al medio de cultivo una coloración marrón con matices ocres y amarillentos (Figura 5.3a). El reverso mantenía esta tonalidad con una pigmentación más intensa, ligeramente anaranjada (Figura 5.3b). Se detectó abundante micelio aéreo, de aspecto algodonoso en tono crudo que se extendía aleatoriamente en la superficie, los esporodoquios tenían una coloración beige. Las hifas, con abundantes ramificaciones, eran hialinas, tabicadas y con grosores medios que no superaban las 5  $\mu$ m. Se observaron pocos microconidios, los existentes eran ovalados, ovoides con una base truncada y reniformes; frecuentemente con 1 septo, aunque también podía no darse ninguno, o de forma poco común tener 2, el tamaño osciló de 10 a 12,5 x 2,5 a 3,5  $\mu$ m (Figura 5.3c). Esta especie produce una gran cantidad de macroconidios rectos curvados hacia la parte apical, bastante amplios, con 3 a 5 septos, de 20-38,5 x 3,7-5  $\mu$ m. Las células apicales eran afiladas con forma de gancho y las basales tenían forma de pie con algunas muescas (Figura 5.3d). Las clamidosporas que se desarrollaron en SNA eran unicelulares las terminales y en cadenas cortas las intercalares, con forma redondeada y de tamaño en



torno a 7,5-12,5  $\mu\text{m}$  (Figura 5.3e y 5.3f). Fue frecuente la presencia de células conidiógenas monofálides alargadas y polifálides más cortas (Figura 5.3g y 5.3h). En base a estas características morfológicas, el aislado MLFR-03 se identificó como *Fusarium brachygibbosum*.

En la tabla 5.2 se registra una comparativa de este aislado, con otras especies cercanas de *Fusarium brachygibbosum* que han sido previamente estudiadas.

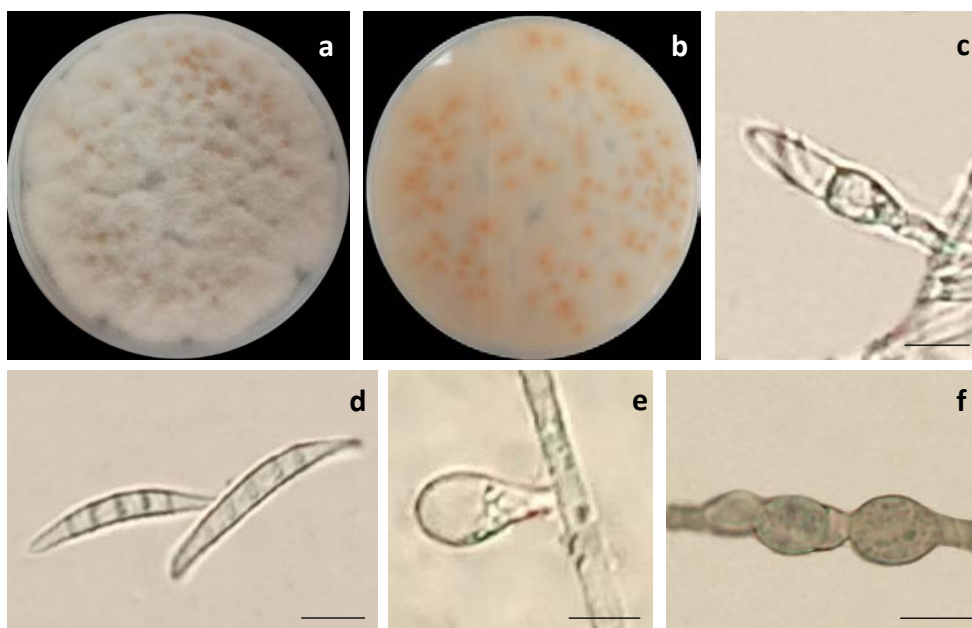
**Tabla 5.2.** Características morfológicas del aislado MLFR-03 causante de la podredumbre de la fruta de melón galia y descripciones previas *Fusarium brachygibbosum*.

Características morfológicas	<i>Fusarium brachygibbosum</i>		Aislado MLFR-03
	Mirhosseini <i>et al.</i> (2014)	Rentería-Martínez <i>et al.</i> (2019)	Este estudio
Colonias en PDA			
Vista superior	Colonias inicialmente blancas, con el tiempo cambiaron de amarillo anaranjado a rojo medio con abundante micelio	Colonias blancas con velloso micelio aéreo que se tornó a amarillo y rosa	Coloración marrón con matices ocres y amarillentos. Abundante micelio aéreo, de aspecto algodonoso en tono crudo
Vista inferior	ND	ND	
Macroconidios	Escasa y muy dispersa		
Forma	ND	Delgada y recta; las células intermedias curvadas hacia la parte basal y las centrales ligeramente anchas. Algunas células basales presentaron una ligera forma de pie y las apicales forma de gancho	Recta y curvada hacia la parte apical, bastante amplia. Las células apicales eran afiladas con forma de gancho y las basales tenían forma de pie con algunas muescas
Largo ( $\mu\text{m}$ )	25,92	31-45	20-38,5
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	4,43	3,28	3,7-5
N.º de septos	3-4	3-5	3-5
Microconidios			
Forma	Curvada, ovoide y fusiforme	Ovalada y ocasionalmente ovoide	Ovalada, ovoide con una base truncada y reniforme
Largo ( $\mu\text{m}$ )	11,05	13,79	10-12,5
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	3,97	3,95	2,5-3,5
N.º de septos	0-2	1 y rara vez con 2 o ninguna	0-2, frecuentemente 1
Clamidosporas			
Forma	Esféricas, terminales e intercalares, simples o en cadenas	Terminales e intercalares, generalmente unicelulares y globosas, solas o en cadenas	Unicelulares las terminales y en cadenas cortas las intercalares, con forma redondeada
Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	11,01	ND	7,5-12,5

Nota. ND: no descrito.

## 5. Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de *Fusarium*

Las colonias del aislado de *Fusarium equiseti* MLFR-07 en PDA eran blancas, con un ligero tono rosado (Figura 5.4a); en el reverso la coloración era más fuerte, virando hacia una tonalidad de salmón a anaranjada (Figura 5.4b). El micelio aéreo fue abundante, lanoso, de color blanco especialmente al inicio y con una leve pigmentación rosada cuando envejecía. Entre los núcleos de las compactas colonias de micelio se podían apreciar puntos viscosos de esporodoquios, de acentuado color melocotón, fácilmente detectables en el reverso del cultivo. A partir de los conidióforos ramificados en esporodoquios se formaron abundantes macroconidios, de gran importancia para la identificación de esta especie, al haber una ausencia de microconidios, tanto en PDA como en SNA. El grosor de las hifas oscilaba entre 3,75 y 5  $\mu\text{m}$ , presentaban ramificaciones y tabiques. Las células conidiógenas se formaron en fiálides de tamaño reducido (12-15 x 2,5-6  $\mu\text{m}$ ), tal y como aparece en la figura 5.4c. Esta especie produce una gran cantidad de macroconidios, con un tamaño que oscilaba de 25 a 55  $\mu\text{m}$  de longitud y de 3,5 a 5  $\mu\text{m}$ , septados (4-7 septos) y con una acentuada curvatura dorsiventral, además, la célula basal tenía forma de pie y la apical de látigo alargada (Figura 5.4d). Las clamidosporas podían darse individuales con forma piriforme o intercalares en cadenas globosas, con paredes gruesas; su tamaño osciló entre 6,5-10  $\mu\text{m}$  (Figura 5.4e y 5.4f).



**Figura 5.4.** Características morfológicas de *Fusarium equiseti* MLFR-07. (a-b) vista superior e inferior de la colonia en PDA tras 10 días a 26 °C, (c) monofiálide corta, (d) macroconidios, (e) clamidospora individual y (f) clamidospora intercalar en cadena. Barra de escala: c = 5  $\mu\text{m}$ , d = 20  $\mu\text{m}$ , e y f = 10  $\mu\text{m}$ .

A partir de las características morfológicas de otras especies próximas de *Fusarium equiseti* se pudo identificar a MLFR-07 como aislado característico de esta especie, tal y como se indica en la tabla 5.3.

**Tabla 5.3.** Características morfológicas del aislado MLFR-07 causante de la podredumbre de la fruta de melón cantalupo y descripciones previas *Fusarium equiseti*.

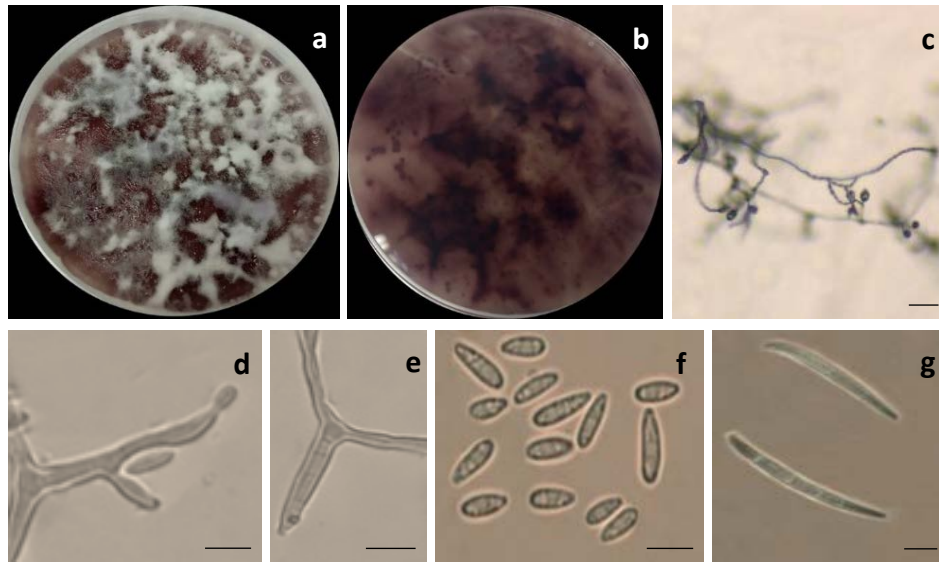
Características morfológicas	<i>Fusarium equiseti</i>		Aislado MLFR-07
	Leslie y Summerell (2006)	Nuangmek <i>et al.</i> (2019)	Este estudio
Colonias en PDA			
Vista superior	Inicialmente blanco; el color se vuelve marrón con la edad	Aspecto suelto, a veces más afelpado; el color es de blanco a melocotón y se vuelve de ocráceo a beige	Colonias blancas con un ligero tono rosado. El micelio aéreo fue abundante, lanoso, de color blanco al inicio volviéndose rosado al envejecer
Vista inferior	ND	Marrón-amarillento a marrón	Tonalidad salmón a anaranjada
Macroconidios			
Forma	Fuerte curvatura dorsiventral, con una célula apical cónica y alargada y una célula basal con forma prominente en el pie que puede alargarse en apariencia	Pronunciada curvatura dorsiventral, célula apical cónica y alargada con forma de pie prominente.	Acentuada curvatura dorsiventral, la célula basal tenía forma de pie y la apical de látigo alargada
Largo (µm)	25 a > 120	20-50	25-55
Ancho (µm)	ND	2,5-6	3,5-5
N.º de septos	5-7	5-7	4-7
Microconidios	Ausente	Ausente	Ausente
Clamidosporas			
Forma	Globosa	Globosa	Individuales con forma piriforme o intercalares en cadenas globosas
Diámetro (µm)	ND	5-10	6,5-10

*Nota.* ND: no descrito.

Por último, el aislado de *Fusarium annulatum* MLFR-09 presentó en PDA una característica pigmentación violeta (Figura 5.5a). En el reverso la tonalidad era muy morada (Figura 5.5b). En general, el micelio aéreo tenía un aspecto algodonoso, inicialmente blanco, pero gradualmente se volvía violeta al envejecer, llegando incluso a adquirir un tono gris en algunas áreas. Entre las masas de micelio se produjeron algunos esporodoquios con una intensa coloración púrpura. Hubo una escasa presencia de macroconidios, con una disposición recta, delgados, tabicados (3-4 septos), el

5. Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de *Fusarium*

tamaño variaba de 20 a 55  $\mu\text{m}$  de largo y de 3,7 a 5  $\mu\text{m}$  de ancho; la célula apical era roma y la basal con forma de pie (Figura 5.5g).



**Figura 5.5.** Características morfológicas de *Fusarium annulatum* MLFR-09. (a-b) vista superior e inferior de la colonia en PDA tras 10 días a 26 °C, (c) cadenas de microconidios, (d) polifiálides, (e) monofiálide, (f) microconidios y (g) macroconidios. Barra de escala: c = 20  $\mu\text{m}$ ; d, e, f y g = 10  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 5.4.** Características morfológicas del aislado MLFR-09 causante de la podredumbre de la fruta de melón cantalupo y descripciones previas *Fusarium annulatum*.

Características morfológicas	<i>Fusarium annulatum</i>	Aislado MLFR-09
	Bugnicourt (1952), Nelson <i>et al.</i> (1983) y Yilmaz <i>et al.</i> (2021)	Este estudio
Medio de cultivo	Agar Harina de Maíz (CMA)	Agar de Patata y Dextrosa (PDA)
Vista superior	Micelio aéreo ausente o en desarrollo tardío, muy ligero, polvoriento, discretamente dividido en zonas, de color blanco. Los pigmentos de color negrozco-púrpura se producen normalmente en agar	Micelio aéreo de aspecto algodonoso, inicialmente blanco, pero gradualmente se volvía violeta al envejecer, llegando incluso a adquirir un tono gris en algunas áreas
Vista inferior	ND	Acentuada coloración púrpura
Macroconidios		
Forma	De paredes delgadas, fuertemente curvadas y con forma de hoz, con la célula basal claramente con forma de pie	Recta y delgada; la célula apical era roma y la basal con forma de pie
Largo ( $\mu\text{m}$ )	13-58	20-55
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	1,9-3,3	3,7-5
N.º de septos	3-6	3-4
Microconidios		
Forma	Cilíndrico o claviforme con base truncada	Ovoide o casi oval con base truncada y pocas veces fusiforme
Largo ( $\mu\text{m}$ )	4,7-14,4	5,2-13,5
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	1,7-2,3	2,5-3,2
N.º de septos	0-1	0
Clamidosporas	Ausente	Ausente

Nota. ND: no descrito.

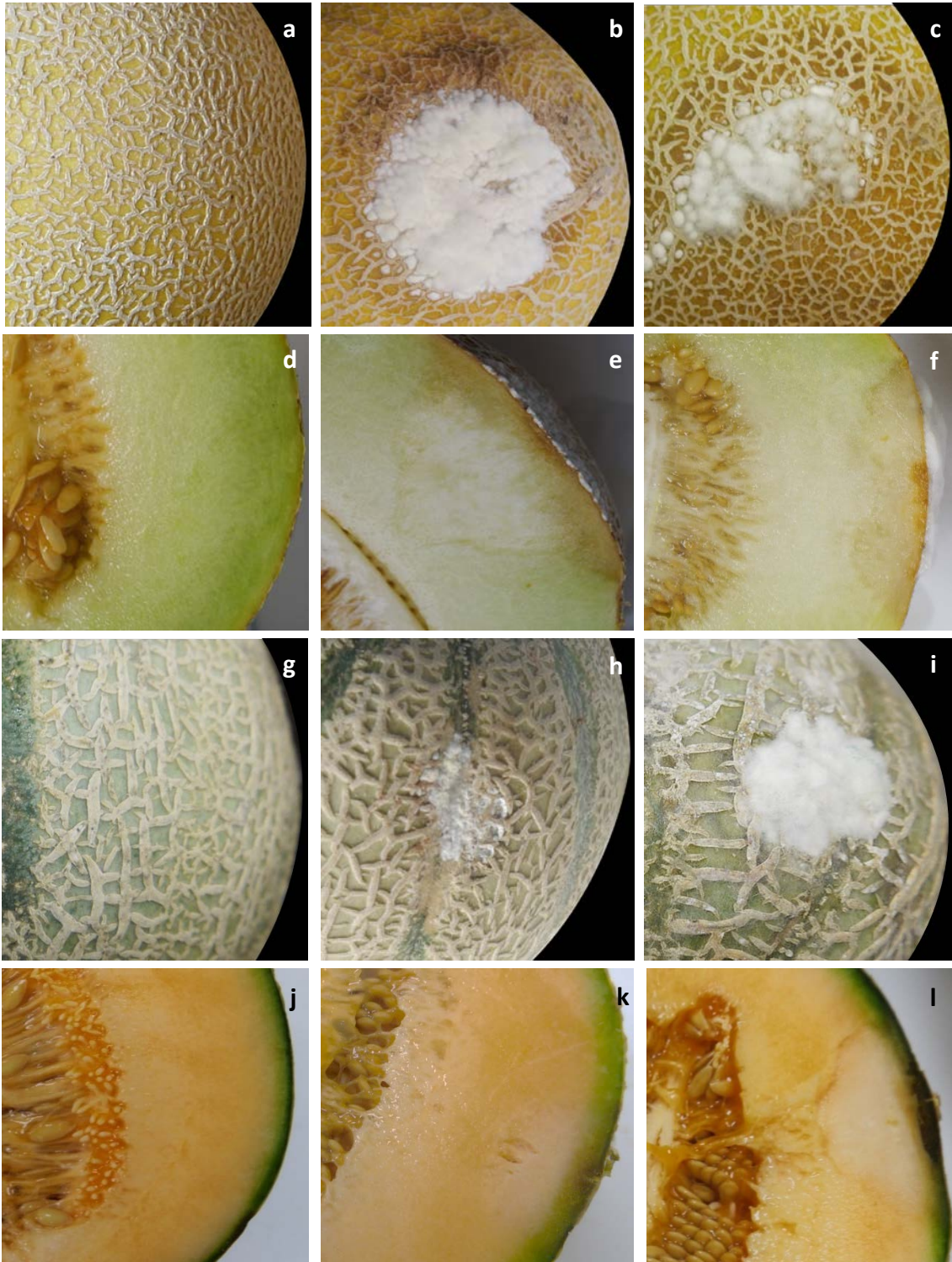
La producción de microconidios fue superior, se formaron en cadenas de gran longitud (Figura 5.5c) soportadas por monofiálides (Figura 5.5e) y polifiálides (Figura 5.5f). No se detectaron septos, la forma fue variada, desde ovoide o casi oval con base truncada a fusiforme; con un tamaño que oscilaba entre 5,2-13,5 x 2,5-3,2  $\mu\text{m}$  (Figura 5.5f). Hubo ausencia de clamidosporas.

El aislado MLFR-09 fue comparado morfológicamente con la primera descripción publicada de *F. annulatum* en Bugnicourt (1952), también referenciada en Nelson *et al.* (1983) y Yilmaz *et al.* (2021), antes de clasificarse dentro de esta especie (Tabla 5.4).

### 5.3.3. Patogenicidad

Una semana después de la inoculación, un micelio blanco cubrió las heridas de los frutos inoculados con los patógenos (Figuras 5.7b, 5.7c, 5.7h y 5.7i). No se detectó enfermedad en los melones no heridos ni en el tratamiento control (Figuras 5.7a, 5.7d, 5.7g y 5.7j). Todos los aislados de *Fusarium* comenzaron a manifestarse en los frutos 3 días después de la inoculación. En la superficie, apareció inicialmente un halo necrótico de color marrón alrededor del micelio emergente, acompañado de la pérdida de rigidez estructural y depresión del epicarpio de los frutos en esa misma zona. Los signos externos de las sintomatologías fueron similares para ambas variedades, pero en melón galia se detectó un mayor ablandamiento alrededor del punto de inoculación que en cantalupo, condicionado en parte, no solo por el poder patógeno de *Fusarium solani* MLFR-01 y *Fusarium brachygibbosum* MLFR-03, sino también por la propia estructura superficial de esta variedad comercial, siendo menos robusta que la de cantalupo. El avance de los patógenos también fue patente en el mesocarpio de los frutos, donde se produjo un cambio en la coloración de la pulpa, ablandamiento y textura arenosa alcanzando profundidades de entre 3 y 4 cm tras 7 días, especialmente en galia (Figuras 5.7e y 5.7f). El corte transversal de los frutos permitió analizar el tejido limítrofe entre el mesocarpio y epicarpio, estructura que adquirió una coloración parda y conformación oleosa como consecuencia de la clara deshidratación necrótica. Debido a la pérdida interna de textura, se produjeron cavidades o galerías tal y como se puede apreciar en el melón cantalupo colonizado por *Fusarium equiseti* MLFR-07 (Figura 5.6k).

5. Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de *Fusarium*



**Figura 5.6.** Cambios morfológicos tras las pruebas de patogenicidad con *Fusarium solani* MLFR-01 y *Fusarium brachygibbosum* MLFR-03 en melón galia (*Cucumis melo* var. *reticulatus*), *Fusarium equiseti* MLFR-07 y *Fusarium annulatum* MLFR-09 en cantalupo (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) 7 días después de la inoculación. (a-d) fruto control galia herido e inoculado con agua destilada estéril, (g-j) fruto control cantalupo herido e inoculado con agua destilada estéril, (b-e) fruto inoculado con *F. solani* MLFR-01, (c-f) fruto inoculado con *F. brachygibbosum* MLFR-03, (h-k) fruto inoculado con *F. equiseti* MLFR-07 y (i-l) fruto inoculado con *Fusarium annulatum* MLFR-09.

El hongo aprovechó el espacio de estas oquedades como consecuencia de la desecación del mesocarpio para su proliferación. En determinados casos, se pudo formar una especie de quistes constituidos por el tejido hifal compacto que se crea en ese espacio limitando, confiriendo una textura esponjosa a esta sección.

Todos los aislados colonizaron el interior de los frutos. Los análisis morfológicos y moleculares de los patógenos presentes en las heridas demostraron que los aislados de *Fusarium* que habían sido inoculados en la prueba de patogenicidad se volvieron a aislar de los frutos con síntomas, verificando los postulados de Koch.

Se confirmó la patogenicidad de todos los aislados de *Fusarium* para la variedad de frutos de melón en la que habían sido inoculados, tal y como se muestra en la tabla 5.5, a partir de la observación de los síntomas y la comparación con el tratamiento control de frutos heridos e inoculados con agua destilada estéril en el que la tasa de infección fue del 0% (Figura 5.6a y 5.6e). Tampoco aparecieron síntomas en el tratamiento de frutos no heridos e inoculados (Tabla 5.5). En galia, *Fusarium solani* MLFR-01 resultó ser más agresivo que *Fusarium brachygibbosum* MLFR-03, alcanzando un promedio de ISE del 92% para el primero frente al 83,7% para el segundo. En *Fusarium brachygibbosum* MLFR-03 no se alcanzó el 100% de porcentaje de infección porque se produjo algún tipo de contaminación cruzada que impidió el desarrollo de la enfermedad. Para cantalupo, el poder patógeno de *Fusarium annulatum* MLFR-09 (89,75%) fue superior al de *Fusarium equiseti* MLFR-07 (77,5%). Este efecto también se vio reflejado en su porcentaje de infección (90%), ya que hubo piezas en las que no se llegó a desarrollar nunca la enfermedad a pesar de haber sido heridas e inoculadas con este patógeno. La severidad de los daños fue similar a los ocasionados en los frutos por infección natural en el momento del aislamiento (Figura 5.1).

El análisis microscópico de los patógenos presentes en las heridas demostró que los aislados de *Fusarium* que habían sido inoculados en la prueba de patogenicidad se volvieron a aislar de los frutos con síntomas (datos no presentados). Se mantuvieron las características morfológicas y moleculares de los aislados originales, hecho que verifica los postulados de Koch.

## 5. Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de *Fusarium*

**Tabla 5.5.** Prueba de patogenicidad e índice de severidad de la enfermedad causada por diferentes aislados de *Fusarium* en frutos de melón galia (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) y cantalupo (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*).

Variedad	Inóculo	Porcentaje de infección		Promedio ISE <sup>a</sup> (%)	
		Heridos	No heridos	Heridos	No heridos
Galia	<i>F. solani</i> MLFR-01	100	0	92,0 ± 11,3	0
Galia	<i>F. brachygibbosum</i> MLFR-03	95	0	83,7 ± 15,9	0
Galia	Agua destilada estéril	0	0	0	0
Cantalupo	<i>F. equiseti</i> MLFR-07	90	0	77,5 ± 21,2	0
Cantalupo	<i>F. annulatum</i> MLFR-09	100	0	89,7 ± 11,0	0
Cantalupo	Agua destilada estéril	0	0	0	0

Nota. ISE<sup>a</sup>: índice de severidad de la enfermedad.

### 5.4. Discusión

En cucurbitáceas, una de las enfermedades más usuales que afecta a la fruta antes y después de la cosecha es la causada por varias especies de *Fusarium* (Nuangmek *et al.*, 2019). En este trabajo, se realizó una caracterización morfológica, molecular y patogénica de diferentes especies de *Fusarium* que se desarrollaron de forma natural en melones procedentes de diferentes zonas productoras de España, concretamente de la provincia de Murcia y Castilla la Mancha. El estudio permitió distinguir en melón galia (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) a *Fusarium solani* (FSSC) y *Fusarium brachygibbosum* (FSAMSC), mientras que en melón cantalupo (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) se identificó *Fusarium equiseti* (FIESC) y *Fusarium annulatum* (FFSC).

Medeiros Araújo *et al.* (2021) hallaron una gran diversidad de especies patógenas de *Fusarium* en esta cucurbitácea, alertando de la complejidad de este sistema y promoviendo un estudio más profundo. Es importante dilucidar las interacciones que se producen porque el melón es un huésped potencial de estos patógenos. Los cuatro aislados sometidos a estudio presentaron características morfológicamente diferentes, especialmente en cuanto a la forma y tamaño de los conidios o a la presencia/ausencia de células conidiógenas y clamidosporas.

En España, *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* ha sido descrito causando enfermedad en plantas de melón, lo que provocó la marchitez y muerte del vegetal a partir de la manifestación de una necrosis basal del tallo (Gómez *et al.*, 2014). Sobre los daños que puede causar en los frutos no hay reportes a nivel de España, aunque autores como



Champaco *et al.* (1993) probaron en Texas, bajo condiciones de laboratorio, la facultad que tenían diversos aislados saprófitos de *Fusarium solani* de provocar una descomposición potencial de la fruta de melón, concluyendo que fueron capaces producir una amplia pudrición en la misma. En este estudio, se comentaba también la importancia de la humedad climática como factor determinante en la podredumbre de los frutos maduros. Esta consideración fue valorada en el desarrollo del análisis de patogenicidad de este trabajo, tratando de crear una alta humedad relativa en el espacio donde se conservaron los frutos, hecho que se tradujo en una elevada incidencia de la enfermedad (Tabla 5.5). Para poder diferenciar especies patógenas de *F. solani* es importante recurrir a métodos moleculares que faciliten su identificación filogenética, siempre en combinación con un análisis morfológico. Además, estos hongos presentan un alto nivel de polimorfismo y mecanismos de variación genética que pueden ocasionar que cepas no patógenas de *Fusarium sp.* pasen a ser patógenas (Villarino *et al.*, 2019). El conglomerado 3 de FSSC alberga aislados de *Fusarium* con una gran capacidad de producir conidios, desarrollarse y sobrevivir (O'Donnell *et al.*, 2008). Esta cualidad se vio reflejada en el aislado de *Fusarium solani* MLFR-01. Si se compara con el resto de aislados de este estudio puede afirmarse que fue el aislado que alcanzó un mayor índice de desarrollo de la enfermedad.

Los últimos estudios publicados asocian frecuentemente al complejo de especies FIESC como responsables de la podredumbre de melón (Lima *et al.*, 2021). Algunos miembros de este complejo han causado importantes pérdidas en el cereal español (Marín *et al.*, 2012; Castellá y Cabañes, 2014) y de forma menos usual, recientemente en la vid (Astudillo-Calderón *et al.*, 2019).

*Fusarium equiseti* es un hongo cosmopolita, coloniza raíces y tejidos vegetales y ha sido registrado en muchas partes del mundo (Leslie y Summerell, 2006). Nuestro aislado de *F. equiseti* MLFR-07 fue el que menos severidad mostró, pero su patogenicidad no es más importante que su presencia en esta área y vegetal, el hallazgo de esta asociación hospedero-patógeno puede estar condicionado por el impacto que supone el cambio climático en la distribución geográfica de las especies (Castellá y Cabañes, 2014). Estas requieren de unas condiciones climáticas específicas para su desarrollo. En un clima cambiante las poblaciones pueden verse alteradas ante un proceso que les permita

## 5. Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de *Fusarium*

adaptarse a la nueva situación medioambiental (Parikka *et al.*, 2012). Otros aspectos a considerar pueden estar relacionados con la susceptibilidad de las variedades de cucurbitáceas a la enfermedad por *Fusarium*, las peculiaridades del ciclo de vida del patógeno, las condiciones ambientales o la ineficacia de los tratamientos de control (Ramdial *et al.*, 2017). Las peculiaridades del ciclo de vida del patógeno, como la capacidad de permanecer en el suelo incluso en ausencia del hospedero, contribuyen a aumentar tanto la incidencia como la persistencia de esta enfermedad transmitida por el suelo.

*Fusarium annulatum* es un patógeno que se encuentra en climas tropicales y templados y que afecta a diversos cultivos en todo el mundo (Yilmaz *et al.*, 2021). Según Nelson *et al.* (1992) se considera una especie poco común, en parte debido, como se ha mencionado anteriormente, a que en el pasado *F. annulatum* se ha estudiado a menudo como *Fusarium proliferatum* (Yilmaz *et al.*, 2021).

En España, *F. proliferatum* ha sido un patógeno frecuente en la producción del ajo, causando podredumbre durante el almacenamiento (Gálvez *et al.*, 2017). Su presencia también se ha detectado en el cultivo de la fresa, provocando la marchitez vascular (Borrero *et al.*, 2019). En México Rivas-García *et al.* (2018) lo aislaron originando podredumbre en frutos de melón. Según estos autores, los frutos afectados mostraban un oscurecimiento y engrosamiento del tejido, el epicarpio se deshidratava y adquiría una coloración blanca ligeramente rosada. En nuestro caso, la coloración rosa-violácea no se detectó en el micelio que se desarrolló en el fruto, pero sí durante el posterior aislamiento del patógeno en medio de cultivo sintético. De ahí la dificultad de distinguir las diferentes especies de *Fusarium* únicamente en base a los síntomas que presentan porque solo producen pigmento cuando crecen en medio de cultivo sintético, tal es el caso del resto de aislados de *Fusarium* de este trabajo.

Al nivel morfológico, *F. annulatum* fue descrito por Bugnicourt (1952) como productor de macroconidios con forma de anillo. Basándose en esta descripción original, Nelson *et al.* (1983) indicaron que *F. annulatum* es básicamente un *F. proliferatum* con macroconidios fuertemente curvados. Sin embargo, Yilmaz *et al.* (2021) mencionaron que esta característica es atípica de la especie porque la mayoría de los aislados de *F. annulatum* tienden a producir macroconidios rectos (Figura 5.5g).

*F. annulatum* pertenece al complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (Yilmaz *et al.*, 2021), anteriormente designado como complejo de especies de *Gibberella fujikuroi* (GFC) (Wigmann *et al.*, 2019). Tres conglomerados forman el complejo GFC, perteneciendo la especie *F. annulatum* al conglomerado asiático (O'Donnell *et al.*, 1998). El complejo FFSC incluye tres especies representativas que son *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides* (Choi *et al.*, 2018). Las especies de este complejo destacan por su capacidad de producir micotoxinas, concretamente fumonisinas, derivadas de policétidos (Bashyal *et al.*, 2019). La salud del consumidor se puede ver comprometida ante la presencia de micotoxinas en los alimentos (Esan *et al.*, 2020). En los seres humanos, las fumonisinas pueden causar lesiones cutáneas y están relacionadas con el cáncer de hígado y esófago (Choi *et al.*, 2018).

Se estudió la capacidad de *F. annulatum* Bugnicourt (1952) para producir fumonisina (Nelson *et al.*, 1992) y moniliformina (Schütt *et al.*, 1998), resultando negativo en ambos casos. Según Nelson *et al.* (1992), este resultado puede deberse a que las cepas que se cultivan en un medio rico en carbohidratos durante un periodo prolongado presentan frecuentemente una pérdida de virulencia y, en ocasiones, una pérdida de producción de micotoxinas. Se requieren aislados adicionales de *F. annulatum* para poder evaluar con exactitud su capacidad de producir micotoxinas (Rheeder *et al.*, 2002).

El resto de especies de *Fusarium* no son ajenas a la producción de micotoxinas, *Fusarium equiseti* es capaz de producir zearalenona, varios tricotecenos, fusarocromanona y otros compuestos (Ji *et al.*, 2019; Munkvold, 2017). *Fusarium solani* se ha informado que genera naftoquinonas, moniliformina y ácido fusárico (Munkvold, 2017) y para *Fusarium brachygibbosum* se ha registrado recientemente la producción de beauvericina, neosolaniol y diacetoxiscirpenol (Rabaaoui *et al.*, 2021).

En los nuevos aislamientos de *Fusarium* sp., es importante llevar a cabo una identificación molecular precisa del patógeno, para poder establecer relaciones con los organismos productores de micotoxinas, lo que evitará que los productos agrícolas dejen de ser inadecuados para su consumo (Ramdial *et al.*, 2017). De igual forma, si se quieren tomar medidas fitosanitarias acertadas, tal y como sugieren Tirado-Ramirez *et al.* (2021) es crucial identificar y determinar la virulencia de la especie de *Fusarium*.

## 5. Fusariosis del fruto de melón causada por distintas especies de *Fusarium*

*Fusarium brachygibbosum* pertenece al complejo de especies de *Fusarium sambucinum* (FSAMSC). Su ciclo de vida no se ha informado con exactitud, se sabe que los conidios asexuales (macroconidios y microconidios) le aseguran su supervivencia en el suelo (Ali *et al.*, 2020). En el complejo de especies de FSAMSC se incluyen importantes patógenos agrícolas, entre los que destaca *Fusarium graminearum*, que afecta al rendimiento de cereales y está asociado a la producción de micotoxinas, concretamente tricotenos (Laraba *et al.*, 2021). En cucurbitáceas, *Fusarium brachygibbosum* ha sido descrito en cultivos de sandía en Méjico, causando la marchitez de la planta a nivel de la base del tallo e inicio de la raíz (Rentería-Martínez *et al.*, 2015). Una de las descripciones morfológicas más completas de *F. brachygibbosum* la encontramos en Rentería-Martínez *et al.* 2019. Esta descripción difiere en algunos aspectos con la del aislado de *F. brachygibbosum* MLFR-03 (Tabla 5.2), porque no se detectó coloración rosa en el micelio y en general, tanto los macroconidios como los microconidios eran de menor tamaño a lo que comentan estos autores. El tamaño usual de los macroconidios osciló entre 20-30  $\mu\text{m}$ , rango que se ajusta más a lo comentado por Al-Mahmooli *et al.* (2013), Mirhosseini *et al.* (2014) y Xia *et al.* (2018). La presencia de *F. brachygibbosum* en España ha sido escasa, no hay referencias claras que lo sitúen en esta zona geográfica, pero estos riesgos pueden actualizarse y convertirse en un potencial patógeno del melón, tal y como se ha demostrado en las pruebas de patogenicidad (Figura 5.6c).

Los síntomas observados en los frutos, a partir de las inoculaciones artificiales llevadas a cabo durante la prueba de patogenicidad reprodujeron, en todos los casos, la típica podredumbre descrita en los especímenes inicialmente suministrados y que fue similar para todos los aislados: se formó un micelio blanco de tipo de algodonoso, el epicarpio se necrosó y el tejido interno perdió coloración y turgencia. Estas características coincidían en muchos aspectos con las descripciones llevadas a cabo por Rivas-García *et al.* (2018), Li *et al.* (2019), Nuangmek *et al.* (2019) y Wonglom y Sunpapao (2020) para diferentes aislados de *Fusarium* que afectaron al melón. En general, los resultados indicaron que todos los aislados de *Fusarium* identificados podían causar con éxito podredumbre en el melón.

Los ensayos de patogenicidad también pusieron de manifiesto el resultado anotado por Wonglom y Sunpapao (2020), los frutos de melón debían de herirse para que la

inoculación de los patógenos fuera efectiva (Figura 5.6). Nuangmek *et al.* (2019) sugirieron el momento del corte del pedúnculo, durante la cosecha, como punto de infección en campo. Otro factor determinante podría ser la textura de los tejidos superficiales de las variedades comerciales de melón galia o cantalupo, ya que las propias aberturas naturales facilitarían la infección de estos patógenos. El agrietamiento de los frutos y las zonas de entramado abierto debido a la síntesis defectuosa de lignina y suberina se consideran una vía de infección natural para los patógenos (Martínez *et al.*, 2009). Por otro lado, Champaco *et al.* (1993) comentaron la posible asociación entre la podredumbre de la raíz causada por especies de *Fusarium* y la podredumbre de los frutos. Al ser el melón un vegetal de cultivo superficial, estos actuarían como reservorio de la futura infección, a la espera de una vía de penetración o herida.

Si la penetración del patógeno se produce previo o durante los procedimientos de cosecha, es importante considerar la supervivencia de *Fusarium* sp. en el suelo y en los restos vegetales de cultivos previos, especialmente cuando el vegetal está en contacto estrecho con este espacio. Esta supervivencia va a estar condicionada por la densidad de propágulos iniciales y por la capacidad que tenga la especie de *Fusarium* de producir clamidosporas de larga vida. Para *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, el aislamiento puede llegar a producirse incluso después de un año de la finalización del cultivo (Suárez-Estrella *et al.*, 2004). Ante la dificultad de aplicación de fungicidas que cubran eficazmente el fruto antes de la cosecha (Oliveira *et al.*, 2014), resulta interesante llevar a cabo determinadas prácticas como la biosolarización (Pérez-Hernández *et al.*, 2017), la inmersión de la fruta en agua caliente (Yuan *et al.*, 2013) o el uso de agentes de biocontrol que colonicen de forma natural y ofrezcan protección a las plantas (Mahdikhani y Davoodi, 2016; Dhaouadi *et al.*, 2019; González *et al.*, 2020c). Estas prácticas pueden disminuir la densidad del inóculo y/o aumentar la resistencia del melón a estas enfermedades. Las tendencias de producción actuales buscan reducir los tratamientos fitosanitarios a favor de modelos más respetuosos con el medio ambiente que limiten las enfermedades y mejoren la biología del suelo (Shafique *et al.*, 2016).

Los hallazgos de este trabajo permiten sentar las bases para el diseño de nuevas estrategias de manejo de enfermedades. En todo momento se ha buscado ejercer una gran precisión identificativa para que el futuro control de las fusariosis del melón se lleve

a cabo con mayor exactitud. El conocimiento de la composición genética de aislados locales de *Fusarium* sp. puede mejorar notablemente el manejo de los cultivos y el control de las enfermedades.

Hasta donde sabemos, este es el primer informe en el que las citadas especies de *Fusarium* sp. causan podredumbre de frutos de melón en España.

### **5.5. Conclusiones**

Se aislaron cuatro especies fúngicas, con características macroscópicas diferentes, causando la pudrición de la fruta de melón en dos variedades comerciales de este vegetal: galia (*Cucumis melo* var. *reticulatus*) y cantalupo (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*).

El estudio molecular y morfológico determinó que las especies responsables de las patologías detectadas en los frutos de melón eran, para la variedad galia, *Fusarium solani* y *Fusarium brachyggibosum*, y para cantalupo, *Fusarium equiseti* y *Fusarium annulatum*.

Las pruebas de patogenicidad reprodujeron, en todos los casos, los síntomas de la pudrición natural solo cuando los frutos de melón eran heridos. *Fusarium solani* demostró un mayor índice de severidad de la enfermedad para galia, mientras que para cantalupo, el aislado más agresivo fue *Fusarium annulatum*. Los patógenos aislados de las heridas mantuvieron las características de los frutos originales, verificando de esta forma los postulados de Koch.



## CAPÍTULO 6

---

### Podredumbre por *Rhizopus* en la calabaza

#### 6.1. Introducción

La calabaza pertenece a la familia *Cucurbitaceae* e incluye 12 especies del género *Cucurbita*, que engloba a un conjunto de cultivos de gran importancia económica, entre las que destacan las cuatro especies domésticas *C. pepo*, *C. maxima*, *C. moschata* y *C. mixta* (Vinayashree y Vasu, 2021).

La calabaza butternut (*Cucurbita moschata* Duch.) se cultiva en zonas cálidas y tropicales con suficiente humedad, ha sido utilizada frecuentemente como alimento humano, del que se aprovechan los brotes, flores y sobre todo los frutos para numerosos usos culinarios (Jacobo-Valenzuela *et al.*, 2011). El color anaranjado de su pulpa es un rasgo característico de este tipo de calabaza de invierno y la pigmentación se asocia al contenido total de carotenoides. Así, a mayor intensidad en la coloración, tiene una mayor calidad, hecho que repercute en la aceptación por parte del consumidor (Carvalho *et al.*, 2012; Conti *et al.*, 2015). Los carotenoides ejercen un importante rol en la salud humana, su consumo reduce el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, degenerativas como el cáncer o maculares (Azevedo-Meleiro y Rodríguez-Amaya, 2007). También pueden ayudar en el control de determinados tipos de anemia y para el tratamiento de la diabetes (Rustanti *et al.*, 2015; Song y Sun, 2017). La mayor parte de estos beneficios se debe a su contenido en fibra, sustancias antimicrobianas y antioxidantes (De Escalada Pla *et al.*, 2007; Salehi *et al.*, 2019; Armesto *et al.*, 2020).

Los patógenos causantes de la pudrición de la calabaza a nivel mundial incluyen bacterias, hongos y virus (Kazi *et al.*, 2019a y 2019b). Las pérdidas poscosecha como consecuencia de una infección fúngica tienen lugar cuando los vegetales se almacenan



durante un largo periodo de tiempo a temperaturas frías o altas, o debido a las lesiones mecánicas que se producen durante el almacenamiento y/o transporte, llegando a destruir del 10 al 30% del rendimiento total de los cultivos (Agrios, 2005). Los daños ocasionados por infecciones fúngicas se evitan cuando los vegetales están sanos, enteros, limpios, frescos, sin heridas y libres de humedad anormal (Kwon *et al.*, 2012). El valor nutricional y posibilidades de comercialización de las calabazas infectadas disminuye notablemente y, por lo general, se desechan como inservibles.

La calabaza permite un periodo de almacenamiento largo en comparación con el de otros vegetales, incluso en condiciones ambientales durante varios meses. La temperatura y humedad relativa óptima son 12,2 °C y 70-75%, respectivamente, para un periodo de conservación de 84-160 días (Rahman *et al.*, 2013). La aparición de pudrición se asocia frecuentemente a las condiciones de almacenamiento (temperatura y HR), pero también depende de otros aspectos como la composición de la pulpa o estado de madurez del fruto en el momento de la cosecha. La mejor calidad de conservación en la fruta se obtiene ante una recolección temprana y esto se asocia con niveles más bajos de acidez titulable y sólidos solubles (azúcares y ácidos) en la cosecha (Hurst *et al.*, 1995). En el avance de la conservación la sacarosa y sólidos solubles de la pulpa aumentan, mientras que los niveles de almidón y materia seca disminuyen (Harvey *et al.*, 1997).

Las podredumbres fúngicas de los frutos de calabaza se deben a infecciones causadas por *Phytophthora capsici* (podredumbre por *Phytophthora*), *Fusarium* sp. (podredumbre por *Fusarium*), *Didymella bryoniae* (podredumbre negra) y *Sclerotinia sclerotiorum* (podredumbre por *Sclerotinia*) (Babadoost y Zitter, 2009). En calabaza butternut también se han detectado patógenos fúngicos de otros géneros como *Rhizopus stolonifer* (Kwon *et al.*, 2000) *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* (Kazi *et al.*, 2019a), *Stagonosporopsis cucurbitacearum* (Moumni *et al.*, 2019), *Pythium aphanidermatum* (Sevel *et al.*, 2020) y *Choanephora cucurbitarum* (Emmanuel *et al.*, 2021).

La podredumbre blanda causada por *Rhizopus* sp. puede darse en cualquier parte del mundo durante el periodo poscosecha, afectando a la cantidad y calidad de los vegetales cosechados (Agrios, 2005). Algunas especies de *Rhizopus* son patógenos oportunistas,

se transmiten por el aire y su crecimiento se ve favorecido ante condiciones de alta temperatura, humedad y madurez de la fruta (Kwon *et al.*, 2014). En general, la podredumbre por *Rhizopus* provoca el exudado de un líquido claro como consecuencia del ablandamiento y acuosidad de los tejidos afectados (Bautista-Baños *et al.*, 2014). Cuando se inicia la infección, el hongo emerge a través de las heridas y se producen esporangióforos aéreos, esporangios, estolones y rizoides, estos últimos capaces de romper la epidermis ablandada (Agrios, 2005). El micelio se disemina por el punto de infección, esporula, y se forma una masa de esporangios negros en el extremo, que cubren toda la superficie del fruto. Esta infección está estrechamente relacionada con la producción de determinadas enzimas como la poligalacturonasa, que desempeñan un papel fundamental en la colonización de los frutos (Elegado y Fujio, 1993).

*Rhizopus stolonifer* es uno de los patógenos más comunes de este género, Kwon *et al.* (2000) indicaron la ocurrencia de podredumbre blanda causada por esta especie en calabaza (*Cucurbita moschata*). Según describieron, la infección tuvo lugar durante el cultivo; se inició en los pedúnculos, flores y frutos jóvenes, para después trasladarse a los tallos y hojas.

Dentro del complejo de especies de *Rhizopus stolonifer* encontramos dos especies afines menos frecuentes, *Rhizopus sexualis* (G. Smith.) y *Rhizopus americanus* (Hesselt & J.J. Ellis) (Zheng *et al.*, 2007), anteriormente clasificadas como *R. sexualis* var. *sexualis* y *R. sexualis* var. *americanus*, respectivamente. Los caracteres morfológicos y fisiológicos se utilizaron inicialmente para diferenciar ambas especies de este linaje filogenético (Schipper, 1984) y posteriormente, la identificación se completó con su estudio molecular (Abe *et al.*, 2006).

Existen varias referencias que sitúan a *R. sexualis* causando descomposición en fresas sulfitadas destinadas a la producción de mermelada (Dakin y Tampion, 1968; Archer y Fielding, 1979; Harris y Dennis, 1979). Aunque esta especie no se haya citado en otros vegetales, este hecho indica que puede, al igual que *R. stolonifer*, desempeñar un papel importante en el deterioro de la fruta procesada antes de su comercialización.

El propósito de este estudio es proporcionar conocimientos sobre el patógeno fúngico del género *Rhizopus*, que provocó una alta incidencia de enfermedad en calabaza butternut durante su almacenamiento. Con este fin, se desarrolló una descripción

patológica, análisis morfológico, fisiológico, molecular y filogenético del patógeno aislado de las heridas; con el objetivo de dar a conocer una interacción hospedero-patógeno no referenciada hasta la fecha y sobre la que se aplicaron los postulados de Koch.

## **6.2. Materiales y métodos**

### **6.2.1. Aislamiento fúngico**

Productores hortofrutícolas de Águilas, provincia de Murcia, España (37°24'22.68''N, 01°34'58.4''O) detectaron un problema de podredumbre en frutos de calabaza butternut (*Cucurbita moschata*) durante el periodo de conservación del vegetal a temperatura ambiente. Los frutos estaban almacenados en palots de plástico (600 L) con escasa ventilación. La recolección se había producido a finales de agosto de 2015 y la podredumbre fue detectada dos meses más tarde. Varias muestras de frutos afectados fueron analizadas en el laboratorio de Fitopatología del Grupo de Protección de Cultivos de la UPCT. Los vegetales mostraban acuosidad, ablandamiento, pérdida de coloración, depresión y colapso de los tejidos en la zona afectada (Figura 6.1a). Se requería de un soporte físico para mantener la estructura del fruto. Abundante micelio algodonoso se abría paso a través de las heridas. También era clara la presencia de daños mecánicos en la superficie, posiblemente ocasionados durante el almacenamiento (Figura 6.1b). Las hifas eran inicialmente blancas y formaban un entramado compacto con una distribución superficial en bandas. En los extremos de las hifas se formaron una gran cantidad de esporangióforos y esporangios de pigmentación oscura (gris a gris negruzco) (Figura 6.1c). Los órganos infectados finalmente se rompían o desintegraban como consecuencia de la podredumbre. Un primer aislamiento se llevó a cabo transfiriendo puntas de micelio de los frutos enfermos a PDA. Para el segundo aislamiento del agente causal, se cortaron pequeñas secciones (0,5 x 0,5 cm) de tejido enfermo de las muestras de frutos infectados y se esterilizaron según el procedimiento descrito en el apartado 3.1 de materiales y métodos generales. Las secciones se colocaron en PDA y se incubaron en oscuridad a 26 °C durante 3 días. Las colonias fúngicas emergentes se purificaron mediante el método de cultivo monospórico. Se

obtuvieron 8 aislados fenotípicamente similares a *Rhizopus* a partir de las muestras de vegetales enfermos. Se examinaron al microscopio los aislamientos recién crecidos en PDA y se comprobó que las características morfológicas eran iguales. Se utilizó el aislado CLBPZ-13 como cepa representativa de este estudio.



**Figura 6.1.** *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* (CLBPZ-13) en frutos de calabaza butternut. (a) síntomas de pudrición blanda en la fruta almacenada previa distribución al mercado (b) daños mecánicos, depresión y micelio superficial y (c) bandas de denso micelio con la presencia de esporangióforos y esporangios.

### 6.2.2. Caracterización morfológica

El aislado CLBPZ-13 se inoculó a partir de fragmentos de micelio de 5 x 5 mm en los medios de cultivo PDA y MEA (Malt Extract Agar). Se utilizaron tres temperaturas de incubación 26, 32 y 40 °C. Las características utilizadas en la identificación fueron: observación microscópica, datos de crecimiento y morfología de las colonias. Las observaciones microscópicas se llevaron a cabo 5 días después de la inoculación. Se evaluó la coloración de las colonias y la presencia de las estructuras propias de la especie, tales como: esporangios, esporangióforos, esporangiosporas, rizoides y columelas. Se realizaron al menos 30 mediciones para cada estructura, registrando el promedio para cada una de ellas.

### **6.2.3. Análisis de la temperatura sobre el desarrollo fúngico**

Para determinar la temperatura óptima de crecimiento micelial de CLBPZ-13 en PDA se incubó a 5, 15 y 25 °C. Para este experimento se utilizaron subcultivos crecidos en PDA durante 3 días a 26 °C. Se hicieron 6 repeticiones para cada temperatura de incubación. CLBPZ-13 se sembró en una placa Petri de cultivo (63,6 cm<sup>2</sup>), que contenía PDA, colocando un pequeño fragmento de micelio (5 x 5 mm) en la zona central. El análisis se llevó a cabo durante 4 días.

Se determinó el área de desarrollo de la colonia, la tasa de crecimiento y la duración de la fase latencia, tal y como se especifica en el apartado 3.2.2 de materiales y métodos generales. El tratamiento de los datos y los equipos de imagen utilizados para la caracterización morfológica también quedan indicados en el citado apartado.

### **6.2.4. Identificación molecular y análisis filogenético**

El aislado CLBPZ-13 se cultivó durante 7 días en PDA a 26 °C para obtener el ADN genómico total del micelio fresco y confirmar su identidad. Se amplificaron y secuenciaron los dominios D1/D2 del extremo 5' del gen que codifica el ARNr 28S con los cebadores NL1 y NL4 y los espacios intergénicos ITS1 e ITS2 que incluyen el gen ARNr 5,8S con los cebadores ITS5 e ITS4, de acuerdo con el procedimiento descrito en los apartados 3.3.2.1 y 3.3.2.2 de materiales y métodos generales. Se utilizaron tres repeticiones del aislado CLBPZ-13.

El análisis filogenético se realizó mediante el software MEGA X, empleando el método de unión de vecinos, tal y como se comenta en el apartado 3.4 de materiales y métodos generales. Se utilizaron 24 secuencias de la región D1/D2 de la subunidad grande (LSU) que habían sido publicadas anteriormente en el GenBank. Las secuencias fueron alineadas y editadas manualmente (Tabla 6.1). Se utilizaron dos cepas de *Penicillium digitatum* (N.º acceso en el GenBank MH 872710 y MH872526) como grupo externo. Para el conjunto final de los datos el número total de posiciones fue de 705.

**Tabla 6.1.** Secuencias de ADN que fueron usadas para el análisis filogenético molecular de *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13.

Especies de hongo	Código aislado/cepa	ADNr 28S D1/D2 (LSU)	
		N.º Genbank	Longitud (pb)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	JS-1008-02	KC412868	729
	ATCC 14037	KU729185	709
	M7RJF	MK070014	707
	HP479	KX980504	609
	Jus7	MW990049	682
<i>Rhizopus sexualis</i>	FSU2531	KJ408555	648
<i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>sexualis</i>	336.39	AB250186	684
<i>Rhizopus sexualis</i> var. <i>americanus</i>	340.62	AB250192	692
<i>Rhizopus delemar</i>	CBS 406.51	MH868444	987
	CBS 386.34	MH867083	996
	CBS 295.31	MH866667	992
	CBS 391.34	MH867087	982
<i>Rhizopus oryzae</i>	CBS 130131	MH877013	958
	CBS 387.34	MH867084	981
	F750	KM249104	945
	NRRL: 5834	HQ435027	895
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	CBS 699.68	HM849669	676
	FSU 5256	JN939137	668
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	BCRC 33706	DQ466603	576
	ATCC 22959	KU729205	678
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i>	CBS 338.62	AB250189	656
	CBS 631.82	HM849668	676
<i>Penicillium italicum</i>	CBS 496.75	MH872710	909
	CBS 719.73	MH872526	907

### 6.2.5. Determinación de la patogenicidad

Los postulados de Koch fueron respaldados por pruebas de patogenicidad realizadas en frutos sanos. Se utilizaron calabazas sanas (*Cucurbita moschata*) en estado de completa madurez, 40 días tras la recolección con un peso que oscilaba entre 0,8-1,8 kg. La esporulación de CLBPZ-13 se consiguió tras su cultivo en PDA durante 6 días a 26 °C. Se preparó una suspensión de esporangiosporas de un único cultivo ajustando la concentración a  $1 \times 10^6$  esporangiosporas/mL en agua destilada estéril. La esterilización de los frutos se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 3.1 de materiales y métodos generales. Con ayuda de una aguja estéril, se realizó una herida en un punto de la superficie a un grupo de frutos. Hubo otro grupo al que no se le practicó la herida. Se infectaron ambos grupos con 0,1 mL de la suspensión de esporangiosporas y los controles se inocularon con agua destilada estéril. Se utilizaron 10 frutos para cada tratamiento y control. Los vegetales se mantuvieron en cámara húmeda con 80% de humedad relativa a  $25 \pm 2$  °C durante 6 días. Las variaciones que se

producían en los frutos fueron registradas diariamente desde el inicio de la prueba. Se determinó el porcentaje de calabazas que desarrollaron infección. El patógeno CLBPZ-13 se volvió a aislar de los frutos comparando su morfología con la de la podredumbre inicial.

### **6.3. Resultados**

#### **6.3.1. Estudio molecular y análisis filogenético**

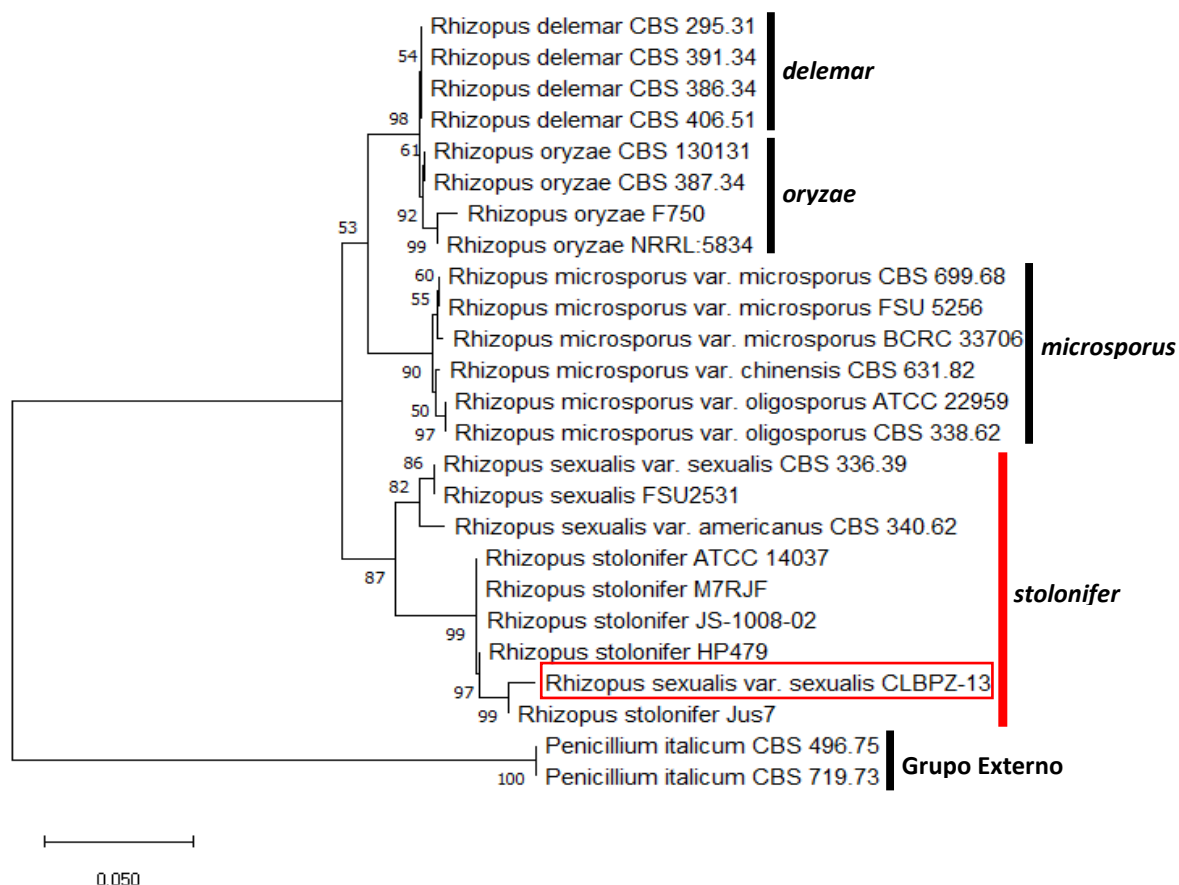
Se obtuvieron diferentes productos de amplificación para la región ITS. La longitud de los tamaños amplificados fue similar, de unos 750-800 pb. No se pudo obtener una secuencia consenso única porque siempre se obtenían varias lecturas que no se podían separar. Los productos de PCR presentaban en el cromatograma una mezcla de picos que impedían su secuenciación.

La presencia de distintos tipos de secuencias ITS es habitual en las dos variedades de la especie *Rhizopus sexualis* (*R. sexualis* var. *sexualis* y *R. sexualis* var. *americanus*), tal y como se demuestra en Abe *et al.*, (2006) y (2010). Este hecho puede ser debido a que ocurra heterocariosis, ya que la especie *Rhizopus sexualis* es una especie homotética dentro del género *Rhizopus*.

Para la región D1/D2 del gen ARNr 28S se obtuvieron tres amplificados idénticos de 728 pb para CLBPZ-13. Como resultado de su comparación con las secuencias existentes en las bases de datos del NCBI, se ha obtenido un 99,73 % de identidad con la cepa Rhs (N.º acceso MG865992), perteneciente a la especie de *Rhizopus stolonifer*. Finalmente, la secuencia LSU de CLBPZ-13 fue depositada en el GenBank con el N.º de acceso MZ666904.

Según el análisis filogenético basado en los dominios D1/D2 del gen ADNr 28S (Liou *et al.*, 2007) y de acuerdo con el método de unión de vecinos, el aislado se incluye en el conglomerado de *Rhizopus stolonifer*, formado por las especies *R. stolonifer*, *R. sexualis* y *R. americanus* (Figura 6.2). Cabe destacar que *R. sexualis* var. *americanus* fue reclasificado como *Rhizopus americanus* por Zheng *et al.* (2007). El trabajo de Liu *et al.*, 2007 concluyó que la especie *R. americanus* era filogenéticamente distinta a *R. sexualis*.

En el árbol filogenético de la figura 6.2 se recogen los cuatro principales grupos o complejos de especies correspondientes a la taxonomía morfológica actual de *Rhizopus* sp., de acuerdo con la mayoría de las especies de este género que se conservan en las colecciones de cultivo: *R. delemar* (o *R. arrhizus* var. *delemar*), *R. oryzae* (o *R. arrhizus*), *R. microsporus* y *R. stolonifer* (Gryganskyi et al., 2018). Existe una estrecha relación filogénica entre *R. delemar* y *R. oryzae*, se agrupan dentro del mismo conglomerado, pero de forma diferenciada, aunque a nivel morfológico no existe distinción (Gryganskyi et al., 2010). Para el linaje filogenético de *Rhizopus stolonifer* se formaron dos conglomerados hermanos. Por un lado, se agruparon los aislados de *R. sexualis* (CBS 336.39 y FSU2531) y *R. americanus* (CBS 340.62) y, por otro, los aislados de *R. stolonifer* (ATCC 14037, M7RJF, JS-1008-02, HP479 y Jus7). Nuestro aislado de *R. sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13 se agrupó con 99% de soporte bootstrap con el aislado Jus7 de *R. stolonifer*.



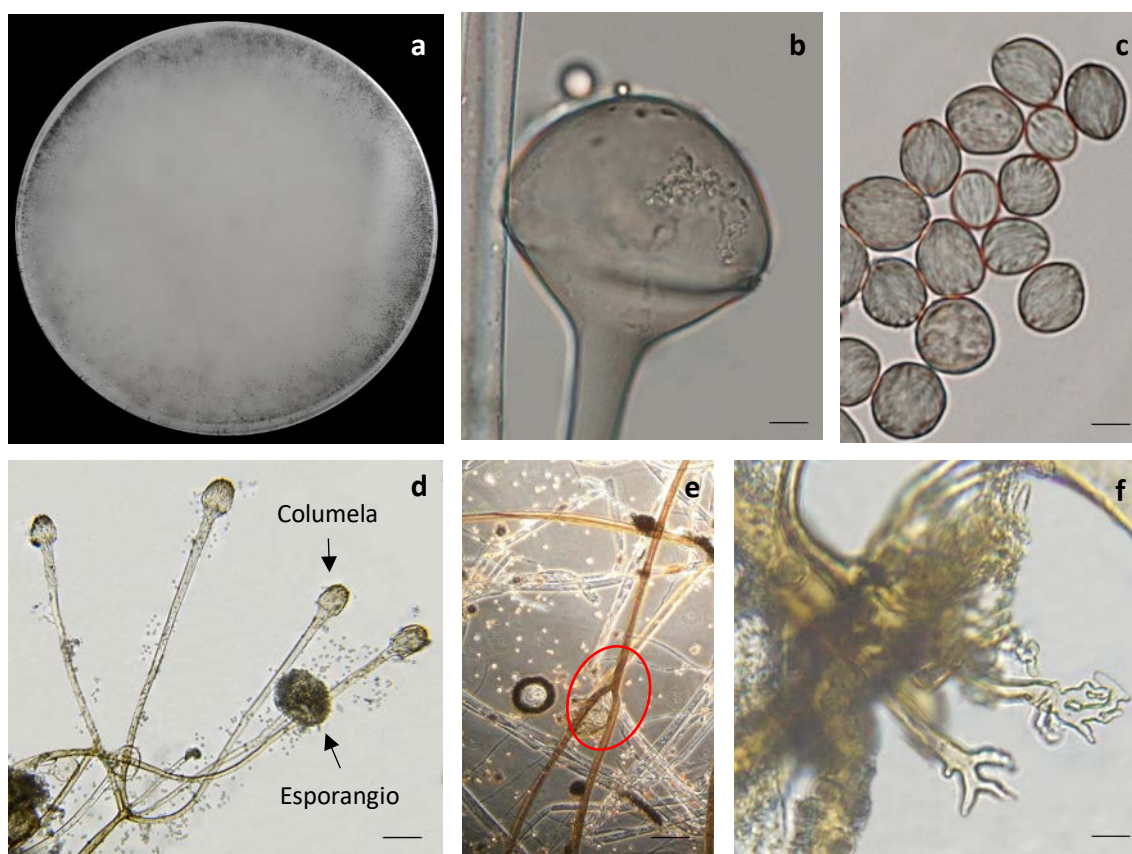
**Figura 6.2.** Árbol filogenético inferido a partir de 705 nucleótidos de la región LSU ADNr D1 y D2 de *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13 y otros aislados del género *Rhizopus* disponibles en el GenBank. Se utilizó el método de unión de vecinos con una prueba de arranque de 2.000 réplicas. Dos cepas de *Penicillium italicum* (CBS 496.75 y CBS 719.73) se emplearon como grupo externo.



Este análisis filogenético ha permitido clasificar al aislado de *R. sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13 en su correspondiente complejo de especies dentro del género *Rhizopus*. Finalmente, el aislado CLBPZ-13 fue depositado en la colección de cultivos MAPYS y se conserva según los métodos que se especifican en el apartado 3.5 de materiales y métodos generales.

### 6.3.2. Características morfológicas

El crecimiento de *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13 fue positivo a 26 °C y negativo a 32 y 40 °C en PDA y MEA. El aislado presentó un desarrollo rápido en PDA a 26 °C, el micelio creció hasta 8 mm de altura tras 4 días. Las colonias estaban claramente definidas, inicialmente eran blancas y tras la formación de los esporangióforos y esporangios se volvían gris oscuro, especialmente en el margen terminal de la placa de cultivo (Figura 6.3a). El reverso era de color blanco sucio.



**Figura 6.3.** Características morfológicas de *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13. (a) colonia en PDA tras 4 días de incubación a 26 °C, (b) columela, (c) esporangiosporas, (d) esporangióforo, (e) ramificación umbeliforme del esporangióforo y (f) rizoides. Barra de escala: b, c = 10  $\mu$ m; d, e = 100  $\mu$ m y f = 20  $\mu$ m.

Los esporangióforos provenían de estolones opuestos a rizoides, de coloración marrón, rectos, sin septos, con paredes lisas, de 20  $\mu$ m de ancho y 1.550  $\mu$ m de largo,

ocasionalmente ramificados, partían de estolones junto a rizoides en grupos de 3 a 6 (Figura 6.3d). A veces podían tener una ramificación superior umbeliforme, característica común de la especie *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* (Schipper, 1984) (Figura 6.3e). Esporangios de hasta 160  $\mu\text{m}$  de diámetro, globosos, inicialmente blanco y luego gris, que albergaban gran cantidad de esporangiosporas de pared transparente (Figura 6.3d).

**Tabla 6.2.** Características morfológicas del aislado *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13 causante de la pudrición de la calabaza butternut y especies relacionadas.

<b>Características morfológicas</b>	<i>R. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	<i>R. sexualis</i> var. <i>americanus</i>	<i>R. sexualis</i> var. <i>sexualis</i>	<i>R. sexualis</i> var. <i>sexualis</i>
	Schipper (1984)	Schipper (1984)	Schipper (1984)	Este estudio
Colonia en PDA				
Vista superior	Colonia blanquecina, con micelio aéreo estéril y manchas negras de esporangios y esporangióforos oscuros	Colonia de contorno irregular	Colonia blanquecina con abundante micelio estéril	Colonias blanquecinas a marrón, abundante micelio. Puntos negros debido a los esporangióforos y esporangios
Esporangióforos	Color marrón, en estolones, en grupos de 1-3 a veces más	ND	Color marrón, en estolones, ramificación superior umbeliforme	Color marrón, rectos, sin septos, paredes lisas, ramificación superior umbeliforme
Largo ( $\mu\text{m}$ )	2.000	700	1.500	1.550
Ancho ( $\mu\text{m}$ )	20	8	20	20
Esporangios	Color negruzco, de aspecto polvoriento	ND	Color negruzco, aspecto polvoriento	Globoso, inicialmente blanco y luego gris
Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	275	< 75	175	160
Columelas	Color gris, cónicas	Subglobosas-aplanadas	Color gris, cónicas-cilíndricas	Color gris, globosas-cónicas-espatuladas
Altura ( $\mu\text{m}$ )	< 140	< 30	< 100	< 90
Esporangiosporas	Angulares-globosas-elipsoidales, claramente estriadas	Aparato esporádico poco desarrollado	Angulares-globosas-elipsoidales, claramente estriadas	Angulares-globosas-elipsoidales o irregulares, lisas o distintamente estriadas
Longitud ( $\mu\text{m}$ )	< 13	ND	13 (-15)	< 13
Rizoides	Bien desarrollados	ND	Pocos y pequeños	Pequeños, lisos, hialinos o de color marrón claro
N.º GenBank (LSU)	AB113023	MH869767	MH867536	MZ666904

Nota. ND: no descrito.

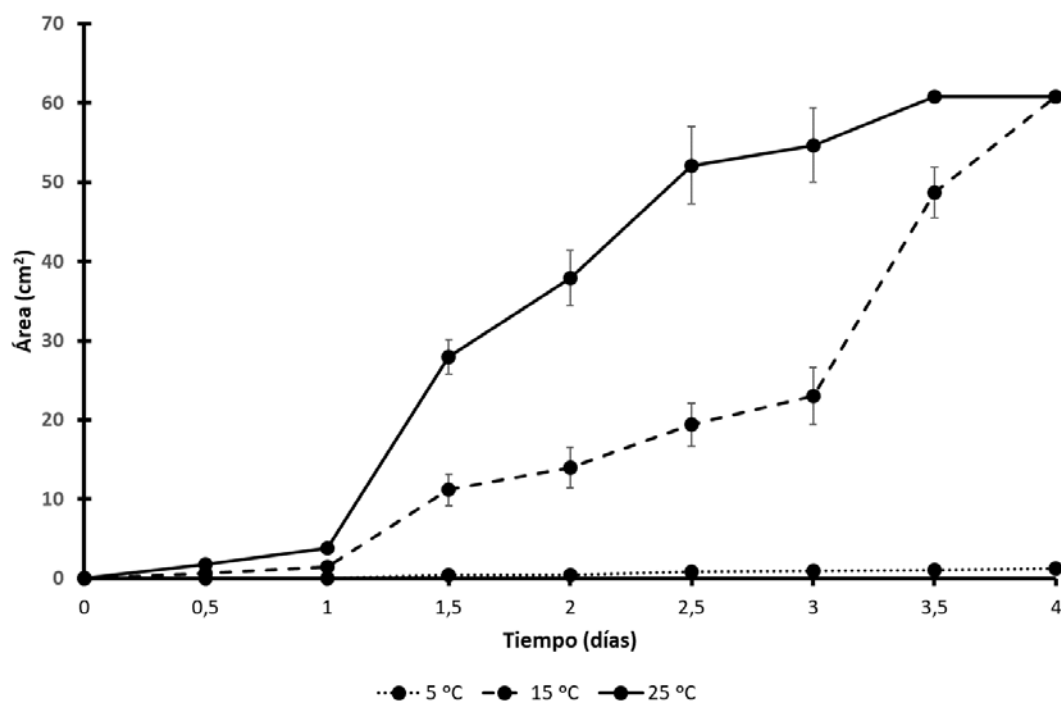
Se produjo una abundante esporulación, las esporangiosporas eran angulares-globosas-elipsoidales o irregulares, color gris claro, de hasta 13  $\mu\text{m}$  de longitud, con paredes gruesas, lisas o distintamente estriadas (Figura 6.3c). Columelas de color gris, forma globosa-cónica-espatulada y con una altura inferior a 90  $\mu\text{m}$  (Figura 6.3b).

Se detectó la presencia de rizoides de pequeño tamaño, lisos, hialinos o de color marrón claro, que se ramificaban una o varias veces en el ápice (Figura 6.3f), características que cumple con lo sugerido por Zheng *et al.* (2007) para *Rhizopus sexualis* var. *sexualis*.

El aislado CLBPZ-13 fue identificado como *Rhizopus sexualis* var. *sexualis*. En la tabla 6.2 se recoge una comparativa de sus características morfológicas con las de otros aislados próximos de *Rhizopus* sp., entre los que se incluye una cepa de la misma especie y variedad.

### 6.3.3. Efecto de la temperatura sobre el desarrollo micelial

Se estudió *in vitro* el desarrollo del hongo *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13, a diferentes temperaturas de incubación (5, 15 y 25  $^{\circ}\text{C}$ ). El aislado presentó diversas cinéticas de crecimiento en función de este factor ambiental (Figura 6.4).



**Figura 6.4.** Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13, agente causal de la podredumbre blanda de la calabaza butternut en PDA a 5, 15 y 25  $^{\circ}\text{C}$ .

A 5  $^{\circ}\text{C}$  se produjo un retardo en el desarrollo del hongo, no llegando a cubrir el micelio

la extensión total de la placa de cultivo tras 4 días después de la siembra, con un área de 1,25 cm<sup>2</sup>. La duración de la fase de latencia se alargó hasta aproximadamente las 39 horas, con una tasa de crecimiento de 0,31 cm<sup>2</sup>/día. El efecto de esta temperatura impidió la formación de micelio aéreo y en su consecuencia, de esporangios.

La curva de desarrollo micelial de *R. sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13 a 15 °C mostró una mayor velocidad de desarrollo respecto a la temperatura de 5 °C. Se produjo una breve fase de latencia, siendo inferior a 20 horas. La tasa de crecimiento fue de 17,2 cm<sup>2</sup>/día, lo que permitió que el aislado completara la extensión de la placa de cultivo al cuarto día. El micelio aéreo y los esporangios comenzaron a formarse a las 39 y 67 horas respectivamente.

Es a la temperatura de 25 °C con la que se obtiene una mayor velocidad de desarrollo de este aislado, la fase de latencia fue inferior a 10 horas, con una tasa de crecimiento de 19,7 cm<sup>2</sup>/día, completándose el desarrollo micelial en placa antes del cuarto día. Si comparamos el crecimiento del micelio entre el segundo y tercer día de incubación, a 25 °C es más del doble (51,1 cm<sup>2</sup>) que a 15 °C (19,4 cm<sup>2</sup>). Este rápido desarrollo también se vio reflejado en la aparición del micelio aéreo (24 horas) y en la formación de los esporangios (39 horas).

#### **6.3.4. Test de patogenicidad**

Tras 48 horas de incubación a 25 °C y 80% de humedad relativa, todos los frutos que habían sido heridos e inoculados empezaron a desarrollar síntomas de pudrición fúngica similares a los de la fruta suministrada por los productores locales. Los frutos no heridos e inoculados y los controles permanecieron asintomáticos (Figura 6.5a). La infección se inició en el punto de inoculación de los frutos testados, en un principio se produjo un ablandamiento de la corteza y desarrollo de micelio algodonoso de color blanco. El avance superficial de la podredumbre quedó perfectamente delimitado, existía una depresión y cambio en la coloración entre el tejido sano y el enfermo (Figura 6.5b). A las 72 horas de incubación el micelio comenzó a tomar una tonalidad gris oscura como consecuencia de la formación de esporangios y esporangióforos y las lesiones alcanzaron un diámetro de 3 cm (Figura 6.5b). Se produjo una completa descomposición acuosa de los tejidos tras 6 días y la infección avanzó progresivamente hasta que el fruto se cubrió de micelio (Figura 6.5c).

El porcentaje de infección fue de un 100% cuando los frutos de calabaza butternut fueron heridos artificialmente y de un 0% para el tratamiento de frutos no heridos e inoculados. La agresividad de los daños fue igual a la ocasionada en los frutos por infección natural en el momento del aislamiento (Figura 6.1).

El hongo causal se volvió aislar de las calabazas infectadas artificialmente. Las características morfológicas del patógeno presente en las heridas de los frutos inoculados fueron las mismas que la del aislado original. El análisis microscópico y molecular permitió identificar a *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13, verificando los postulados de Koch en esta prueba de patogenicidad.



**Figura 6.5.** Test de patogenicidad de *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13 en calabaza butternut. (a) control tratado con agua en lugar de inóculo, (b) estado externo de la infección tras 3 días y (c) fruto con descomposición acuosa cubierto de micelio tras 6 días.

#### 6.4. Discusión

En una primera valoración, se creyó que el patógeno causante de la podredumbre blanda en frutos de calabaza butternut era *Rhizopus stolonifer*. Tras su análisis

microscópico preliminar, se pudo comprobar que se trataba de un mucoral, pero difería morfológicamente de la estructura propia de dicha especie.

Tradicionalmente, la identificación de las especies que integran el género *Rhizopus* sp. se ha basado en los enfoques morfológicos y fisiológicos (Hartanti *et al.*, 2015). La clasificación de *Rhizopus* sp. de acuerdo con Schipper (1984) y Schipper y Stalpers (1984), se fundamentó en la temperatura de crecimiento y esporulación, el tamaño de esporangióforos y esporangios y la ramificación de los rizoides. Según esta clasificación el género quedaba dividido en tres grupos: *R. microsporus*, *R. oryzae* (o *R. arrizus*) y *R. stolonifer*. La mayoría de los hongos de *R. microsporus* son termotolerantes (crecimiento hasta 45 °C), *R. oryzae* incluye hongos subtermotolerantes (37-40 °C) y en *R. stolonifer* se agrupan los hongos mesófilos (Hoffmann *et al.*, 2013). Que el aislado CLBPZ-13 no creciera a una temperatura superior a 32 °C era un indicativo de su pertenencia al grupo de *R. stolonifer* (mesófilo).

Las descripciones morfológicas llevadas a cabo con Schipper (1984) para diferentes cultivos del grupo *R. stolonifer* (*R. stolonifer* var. *stolonifer*, *R. sexualis* var. *sexualis* y *R. sexualis* var. *americanus*) disponibles en Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Países Bajos), son lo suficientemente claras como para poder distinguir morfológicamente a cada especie.

Por un lado, *R. sexualis* var. *sexualis* tiene esporangióforos, esporangios y columelas más grandes que *R. sexualis* var. *americanus* (Liou *et al.*, 2007).

Además, presenta una ramificación umbeliforme del esporangióforo que no aparece en *R. stolonifer* var. *stolonifer* (Figura 6.3e). Ambas especies se parecen en la forma y tamaño de sus esporangiosporas, pero difieren en el tamaño de los esporangióforos, esporangios, columelas y rizoides, siendo relativamente más pequeños para *R. sexualis* var. *sexualis* (Schipper, 1984) (Figura 6.3).

En base a las características morfológicas, el aislado CLBPZ-13 se identificó con *R. sexualis* var. *sexualis* (Tabla 6.2).

La identificación molecular indicó la presencia de múltiples secuencias ITS para CLBPZ-13, característica que se da, tal y como indicaron Abe *et al.* (2006) en cepas de las especies *R. sexualis* var. *sexualis* y *R. sexualis* var. *americanus*. Según estos autores, este

fenómeno se debe a la manifestación de una heterocariosis casual. Además, ambas especies son homotáticas, mientras que la mayor parte de las especies del género *Rhizopus* son heterotáticas. El que se den múltiples secuencias de la región ITS del ADNr dificulta la correcta evaluación de las relaciones filogenéticas moleculares de ambas especies, siendo un problema importante a nivel taxonómico.

Liou *et al.* (2007) analizaron como en nuestro caso, la región D1/D2 28S de la subunidad grande del ADNr para 34 cepas del género *Rhizopus*, el filograma basado en esta región mostró que existía divergencia entre *R. sexualis* var. *sexualis* y *R. sexualis* var. *americanus*, aunque el nivel de parentesco fuese superior al 70%. Las diferencias moleculares y morfológicas apoyaban el concepto de considerar a *R. sexualis* var. *americanus* como una variedad separada dentro del género *Rhizopus*. Es entonces cuando *R. sexualis* var. *americanus* se elevó a nivel de especie pasando a ser *R. americanus* (Zheng *et al.*, 2007).

En nuestro caso, se obtuvo una secuencia consenso homogénea de CLBPZ-13 para la región del gen ARNr 28S de CLBPZ-13 que tenía un 99,73% de similitud con la cepa Rhs (N.º acceso MG865992) de *Rhizopus stolonifer*. Esta secuencia fue depositada en el GenBank con el N.º de acceso MZ666904. El análisis filogenético de la región LSU también agrupó a *R. sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13 junto a otro aislado de *R. stolonifer* (Jus7) (Figura 6.2).

Que la secuencia de la región D1/D2 de CLBPZ-13 resulte más parecida a *R. stolonifer* que a *R. sexualis* var. *sexualis* se puede explicar, según Abe *et al.* (2010), porque es posible que las cepas homotáticas de esta especie compartan parte del material genético de *R. stolonifer*. Estos autores obtuvieron para *R. americanus* tres secuencias ITS del ADNr similar a *R. oryzae*, *R. microsporus* y *R. stolonifer*, igual que ocurrió en Liu *et al.* (2007), que identificaron una secuencia similar a *R. oryzae* para la misma especie.

De acuerdo con Schipper (1984), el crecimiento y la esporulación de *R. sexualis* var. *sexualis* se da entre 15-25 °C. El estudio *in vitro* de CLBPZ-13 indicó para ambas temperaturas de incubación una mayor velocidad de desarrollo a 25 °C que a 15 °C, además de una formación de esporangios más temprana a 25 °C. A 5 °C, CLBPZ-13 no consiguió completar su desarrollo en placa.

Dennis y Blijham (1980) estudiaron los factores que afectan a la viabilidad de las esporangiosporas de *R. sexualis*, sobre lo que indicaron que la tasa de pérdida de viabilidad depende del medio de almacenamiento, la temperatura y el inicio de la germinación. Ante un almacenamiento a 20 °C, ya detectaron una pérdida de viabilidad de las mismas. Harris y Dennis (1980) comentaron que la humedad relativa puede marcar un importante efecto sobre la esporulación de *R. sexualis*, y así, la formación de esporangiosporas queda favorecida a humedades del 70 al 80%.

Por tanto, la temperatura y humedad de conservación de la calabaza constituye un factor importante para ejercer un control en el desarrollo de esta enfermedad. Aunque la calabaza sea un vegetal que frecuentemente se conserve a temperatura y humedad relativa ambiente, el almacenamiento en estas condiciones, además de favorecer el desarrollo de este tipo de enfermedades, también va en detrimento de los valores nutricionales de este producto, especialmente en el contenido de ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno y sólidos solubles totales (Rahman *et al.*, 2013).

La gravedad de la enfermedad va a depender de la capacidad que tenga el patógeno de superar el mecanismo de defensa natural del vegetal, o bien de la capacidad que tenga la fruta de inducir resistencia ante la infección (Kazi *et al.*, 2019b). Se justificó que las poligalacturonasas producidas en fresas infectadas con *R. sexualis* eran la principal causa de descomposición y ablandamiento de la fruta (Dakin y Tampion, 1968; Archer y Fielding, 1979).

La prueba de patogenicidad puso de manifiesto que era condición necesaria la existencia de una herida para que *R. sexualis* var. *sexualis* CLBPZ-13 iniciase el proceso infeccioso. A esta misma conclusión también llegaron Bautista-Baños *et al.* (2014) para *R. stolonifer*.

Ante la ausencia de trabajos que analicen tratamientos para el control de *R. sexualis* var. *sexualis*, consideramos buenas medidas preventivas el mantener una correcta higiene de la plantación, evitar que se produzcan daños mecánicos en los frutos y el control de la temperatura y humedad durante el almacenamiento.

Los estudios futuros pueden ir encaminados a la búsqueda de procedimientos y compuestos que permitan un mejor manejo de la enfermedad. Se pueden tomar como referencia los buenos resultados obtenidos en el control de *R. stolonifer* con técnicas



como la radiación ultravioleta (Pan *et al.*, 2004), el uso de aceites esenciales (Alizadeh-Salteh *et al.*, 2010; Tahmasebi *et al.*, 2020), agentes de control biológico como *Pichia membranefaciens* (Qing y Shiping, 2000) y antimicrobianos como la bacilomicina D (Lin *et al.*, 2019).

Hasta lo que sabemos, este es el primer informe de *R. sexualis* var. *sexualis* causando podredumbre blanda en calabaza butternut a nivel mundial.

## 6.5. Conclusiones

El mucoral fitopatógeno *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* fue aislado en frutos de calabaza butternut (*Cucurbita moschata*) causando descomposición por ablandamiento de los tejidos infectados durante la conservación de este vegetal.

La presencia de una ramificación superior umbeliforme en los esporangióforos y de múltiples secuencias ITS indicaron que el aislado pertenecía a la especie *R. sexualis* var. *sexualis*. El estudio filogenético lo encuadró dentro del grupo de *R. stolonifer*.

Se obtuvo una secuencia consenso de la región D1/D2 del gen ARNr 28S del patógeno causal, que fue depositada en el Genbank con el N.º de acceso MZ666904. La secuencia identificada resultó parecida a la de una cepa de *Rhizopus stolonifer*. Esto puede ser debido a que a pesar de que *R. sexualis* var. *sexualis* es una especie homotética, en algún momento debió compartir parte del material genético de *R. stolonifer*.

El estudio fisiológico en el que se analizó *in vitro* el crecimiento de *R. sexualis* var. *sexualis* a varias temperaturas de incubación (5, 15 y 25 °C) puso de manifiesto que a 25 °C se producía una mayor velocidad de desarrollo y formación de esporangios, mientras que a 5 °C no se completaba el desarrollo en placa ni se alcanzaba la esporulación.

La prueba de patogenicidad desveló que para que se reprodujera la enfermedad debía de existir una herida, lo que indica que el patógeno se transmite a través de daños mecánicos inferidos en los frutos. Se completaron los postulados de Koch volviendo a aislar e identificar al patógeno del punto de inoculación.

## CAPÍTULO 7

---

### Conclusiones generales

· El oomiceto *Pythium ultimum* fue aislado de tallos florales internos de brócoli maduro causando una podredumbre acuosa de los tejidos. Aunque inicialmente se sospechó que se trataba de una podredumbre blanda bacteriana al identificarse dos aislados bacterianos en los tejidos descompuestos con actividad pectinolítica, se comprobó que dichas especies no eran capaces de desarrollar la sintomatología, aunque sí que interferían en su desarrollo. La enfermedad se reprodujo con el aislado de *P. ultimum* inoculado en secciones de tallos de brócoli para verificar los postulados de Koch. Sin embargo, no se consiguió reproducir la sintomatología en plantas enteras, hecho que se atribuyó a la combinación específica de diferentes factores (culturales y/o ambientales) que deben influir en el desarrollo de la misma.

· Los frutos de melón de las variedades galia y cantalupo presentan una elevada incidencia de podredumbres por *Fusarium* muy similares en sintomatologías. Sin embargo, no hay estudios que identifiquen las distintas especies que puedan poner de manifiesto una variabilidad de especies, dentro del género, causantes de las podredumbres. Se identificaron morfológica y molecularmente los patógenos fúngicos *Fusarium solani* y *Fusarium brachyggibosum* en melón galia, y *Fusarium equiseti* y *Fusarium annulatum* en cantalupo. Los postulados de Koch fueron verificados aislando nuevamente los patógenos de las heridas. La infección en los frutos solo se produjo en melones heridos artificialmente, lo que denota que son patógenos de herida o asociados comúnmente a la zona peduncular. Los síntomas fueron análogos a los observados en los especímenes suministrados inicialmente. El alto índice de severidad de esta enfermedad puede mermar la calidad a los pocos días de almacenamiento, lo que se traduce en importantes pérdidas económicas durante el periodo poscosecha.

- El zigomiceto *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* fue identificado ocasionando descomposición blanda acuosa en frutos de calabaza butternut. El estudio morfológico del aislado indicó la presencia de una ramificación superior umbeliforme de los esporangióforos, aspecto morfológico que no caracteriza al patógeno común descrito en calabaza asociado al síntoma estudiado: *Rhizopus stolonifer*. El análisis molecular denotó la presencia de múltiples secuencias ITS, como consecuencia de la heterocariosis propia de esta especie. La secuencia de la región D1/D2 del gen ARNr 28S fue similar a *R. stolonifer*, porque *R. sexualis* al ser una especie homotética comparte parte del material genético con *R. stolonifer*. Se obtuvo una alta tasa de crecimiento del aislado a 25 °C y la enfermedad se reprodujo en frutos sanos previamente heridos. El patógeno volvió a ser identificado completándose los postulados de Koch.

Las **futuras líneas de estudio** irán encaminadas a la prevención y el control de estas enfermedades. Este trabajo de identificación y caracterización sirve como punto de partida para la gestión y el control de patógenos potenciales que afectan a los cultivos del sudeste de España. A veces, la identificación obedece solamente a los síntomas y si el signo no está presente, se asocia la sintomatología observada a otra ya descrita. Queda justificada de esta forma la importancia que tiene el diagnóstico correcto de una enfermedad para su control y el conocimiento de las patologías. Las **nuevas propuestas de mejora** en este ámbito deben basarse en la exploración de nuevos patógenos y asociaciones hospedero-patógeno que pasan desapercibidas, como consecuencia de una incorrecta praxis.

## CHAPTER 7

---

### General conclusions

· The oomycete *Pythium ultimum* was isolated from internal flower stalks of mature broccoli causing a watery rot of tissues. Initially, it was suspected to be a bacterial soft rot as two bacterial species with pectolytic activity were identified at the point of infection. However, these species were not capable of developing the symptomatology, although they interfered with its development. The disease was reproduced inoculating the *P. ultimum* isolate into broccoli stem sections to verify Koch's postulates; however, a failure to reproduce the disease on the whole plants may be due to the specific combination of different factors (cultural and/or environmental) influencing the development of the disease.

· Both galia and cantaloupe melon fruits had a high incidence of rot caused by *Fusarium* species which were very similar in the symptomatology description. However, there are no studies identifying such species in order to determine the variability of *Fusarium* species capable of causing decay. The fungal pathogens *Fusarium solani* and *Fusarium brachyggibosum* in galia melon, and *Fusarium equiseti* and *Fusarium annulatum* in cantaloupe melon, were identified at morphological and molecular level. Koch's postulates were verified by isolating the pathogens from wounds. Fruit infection only developed in artificially wounded melons, indicating that they are wound pathogens or commonly associated with the stem area. Symptoms were similar to those observed in the initially supplied specimens. The high severity rates of disease could decrease fruit quality and cause important economic losses during postharvest period.

· The zygomycete *Rhizopus sexualis* var. *sexualis* was identified causing a fungal soft rot in butternut squash fruits. Morphological features of the isolate indicated a umbeliform upper branching of sporangiophores, a morphological aspect that does not characterize

*Rhizopus stolonifer*, a common pathogen in pumpkin associated with the symptom studied. A molecular analysis indicated the presence of multiple ITS sequences associated with a casual heterokaryosis of this species. Sequence of the D1/D2 region of the 28S rRNA gene was found to *R. stolonifer* because *R. sexualis*, being a homothallic species, shares part of the genetic material with *R. stolonifer*. A high growth rate of isolate was detected at 25 °C; the disease only reproduced on previously wounded healthy fruit. The pathogen was re-identified, which verified Koch's postulates.

**Future lines of study** shall be aimed at preventing and controlling these diseases. The study of identification and characterization of this thesis should serve as a starting point for the management and control of potential pathogens affecting crops in south-eastern Spain. Sometimes, the identification is solely based on symptoms, and if the sign is not present, the observed symptomatology is associated with one already known. A correct diagnosis of a disease is thus important for the control and knowledge of the pathologies. **New proposals for improvement** in this area should be based on the exploration of new pathogens and host-pathogen associations that go unnoticed as a result of incorrect practices.

## CAPÍTULO 8

---

### Producción científica resultante del período de realización de esta tesis doctoral

#### · Artículo original publicado, incluido en Journal Citation Reports (JCR)

- Parra, M.A., Gómez, J., Aguilar, F.W., Martínez, J.A. (2022). *Fusarium annulatum* causes Fusarium rot of cantaloupe melons in Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, (en prensa).

#### · Artículos originales publicados, no incluidos en Journal Citation Reports (JCR)

- Martínez, J.A., Ibarra, A., Parra, M.A. (2013). Podredumbre blanda de la médula del brócoli: agentes patógenos aislados y sus posibles implicaciones. *Agrícola Vergel*, 369, 317-321.
- Parra, M.A., Martínez, J.A. (2015). Biotecnología para mejorar la resistencia a las enfermedades ocasionadas por *Botrytis cinerea*. *Biblioteca Horticultura*, 1-60. <http://www.publicaciones.poscosecha.com>
- Parra, M.A., Ibarra, A., Cifuentes, D., Martínez, J.A. (2015). Interacción *in vitro* entre *Pythium ultimum* y bacterias de la rizosfera aisladas de la podredumbre blanda del tallo del brócoli. *Agrícola Vergel*, 388, 333-343.

- Parra, M.A., Martínez, J.A. (2017). Enfermedades y plagas en la poscosecha. *Agricultura*, 1011, 726-732.

• **Comunicaciones a Congresos**

- Parra, M.A., Ibarra, A., Cifuentes, D., Martínez, J.A., (10 de mayo de 2014). *Interactions between Pythium ultimum and rhizosphere bacteria causing stem rot in broccoli* [Presentación en papel]. 66<sup>th</sup> International Symposium on Crop Protection, Ghent, Belgium.
- Parra, M.A., Ibarra, A., Cifuentes, D., Martínez, J.A., (7-10 de octubre de 2014). *Introducción a la patogénesis de la podredumbre del tallo del brócoli: microorganismos implicados y sus interacciones* [Presentación en papel]. XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología, Lérida, España.
- Parra, M.A., Aguilar, F.W., Martínez, J.A., (19 de mayo de 2015). *Fungal populations associated to netting tissue of Galia melons affecting quality during storage* [Presentación en papel]. 67<sup>th</sup> International Symposium on Crop Protection, Ghent, Belgium.

## CAPÍTULO 9

---

### Bibliografía

- Abe, A., Oda, Y., Asano, K., Sone, T. (2006). The molecular phylogeny of the genus *Rhizopus* based on rDNA sequences. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(10), 2387-2393.
- Abe, A., Asano, K., Sone, T. (2010). A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(7), 1325-1331.
- Abo Elgat, W.A.A., Kordy, A.M., Böhm, M., Černý, R., Abdel-Megeed, A., Salem, M.Z.M. (2020). *Eucaliptus camaldulensis*, *Citrus aurantium*, and *Citrus sinensis* essential oils as antifungal activity against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, and *Fusarium culmorum*. *Processes*, 8(8), 1003.
- Abu-Naser, S.S., Kashkash, K.A., Fayyad, M. (2008). Developing an expert system for plant disease diagnosis. *Journal of Artificial Intelligence*, 1(2), 78-85.
- AEMET: Agencia Estatal de Meteorología. Avance climatológico mensual mes de noviembre de 2012 en la Región de Murcia (2012). Recuperado el 24 de mayo de 2021 de <https://n9.cl/k6q2>
- Aghdam, M.S., Bodbodak, S. (2014). Postharvest heat treatment for mitigation of chilling injury in fruits and vegetables. *Food and Bioprocess Technology*, 7(1), 37-53.
- Agisha, V.N., Kumar, A., Eapen, S.J., Sheoran, N., Suseelabhai, R. (2019). Broad-spectrum antimicrobial activity of volatile organic compounds from endophytic *Pseudomonas putida* BP25 against diverse plant pathogens. *Biocontrol Science and Technology*, 29(11), 1069-1089.
- Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. (5ª ed.). Academic Press, New York.
- Agrios, G.N. (2000). *Fitopatología*. (2ª ed.). Limusa.



- Aguayo, E., Escalona, V.H., Artés, F. (2007). Quality of minimally processed *Cucumis melo* var. *saccharinus* as improved by controlled atmosphere. *European Journal of Horticultural Science*, 72(1), 39-45.
- Aktaruzzaman, M., Afroz, T., Lee, Y.-G., Kim, B.-S. (2018). Morphological and molecular characterization of *Fusarium tricinctum* causing postharvest fruit rot of pumpkin in Korea. *Journal of General Plant Pathology*, 84(6), 407-413.
- Ali, H.Z., Hameed, M.S., Abdulrahman, A.A., Saood, H.M. (2020). First report on *Fusarium brachygibbosum* isolate FIR 16 ITS isolated from Iraqi wheat plant. *Journal of Ecological Engineering*, 21(3), 81-86.
- Al-Mahmooli, I.H., Al-Bahri, Y.S., Al-Sadi, A.M., Deadman, M.L. (2013). First report of *Euphorbia larica* dieback caused by *Fusarium brachygibbosum* in Oman. *Plant Disease*, 97(5), 687.
- Al-Tayyar, N.A., Youssef, A.M., Al-Hindi, R.R. (2020). Edible coatings and antimicrobial nanoemulsions for enhancing shelf life and reducing foodborne pathogens of fruits and vegetables: A review. *Sustainable Materials and Technologies*, 26, e00215.
- Alizadeh-Salteh, S., Arzani, K., Omidbeigi, R., Safaie, N. (2010). Essential oils inhibit mycelial growth of *Rhizopus stolonifer*. *European Journal of Horticultural Science*, 75(6), 278-282.
- Ammar, N., Jabnoun-Khiareddine, H., Mejdoub-Trabelsi, B., Nefzi, A., Mahjoub, M.A., Daami-Remadi, M. (2017). Pythium leak control in potato using aqueous and organic extracts from the brown alga *Sargassum vulgare* (C. Agardh, 1820). *Postharvest Biology and Technology*, 130, 81-93.
- Andrés-Yeves, M.F., Arias, M., Bello, A., Borruel, M.L., Fisac, R., Lacasa, A., ... Vares, F. (1991). *Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria.
- Anonymous. (1973). The pathogen. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 79, 15-24.

- Antunes, M.D.C., Cavaco, A.M. (2010). The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 351-366.
- Aravind, R., Kumar, A., Eapen, S.J., Ramana, K.V. (2009). Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification, and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Letters in Applied Microbiology*, 48(1), 58-64.
- Archana, T.J., Gogoi, R., Kaur, C., Varghese, E., Sharma, R.R., Srivastav, M., ... Kumar, A. (2021). Bacterial volatile mediated suppression of postharvest anthracnose and quality enhancement in mango. *Postharvest Biology and Technology*, 177, 111525.
- Archer, S.A., Fielding, A.H. (1979). Polygalacturonase isoenzymes of fungi involved in the breakdown of sulphyted strawberries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30(7), 711-723.
- Armengol, J., José, C.M., Moya, M.J., Sales, R., Vicent, A., García-Jiménez, J. (2000). *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1, a potential pathogen of grafted watermelon production in Spain. *EPPO BULL*, 30(2), 179-183.
- Armesto, J., Rocchetti, G., Senizza, B., Pateiro, M., Barba, F.J., Domínguez, R., Lucini, L., Lorenzo, J.M. (2020). Nutritional characterization of Butternut squash (*Cucurbita moschata* D.): Effect of variety (Ariel vs. Pluto) and farming type (conventional vs. organic). *Food Research International*, 132, 109052.
- Arnon-Rips, H., Cohen, Y., Saidi, L., Porat, R., Poverenov, E. (2021). Covalent linkage of bioactive volatiles to a polysaccharide support as a potential approach for preparing active edible coatings and delivery systems for food products. *Food Chemistry*, 338, 127822.
- Ashajyothi, M., Kumar, A., Sheoran, N., Ganesan, P., Gogoi, R., Subbaiyan, G.K., Bhattacharya, R. (2019). Black pepper (*Piper nigrum* L.) associated endophytic *Pseudomonas putida* BP25 alters root phenotype and induces defense in rice (*Oryza sativa* L.) against blast disease incited by *Magnaporthe oryzae*. *Biological Control*, 143, 104181.

- Astudillo-Calderón, S., Tello, M.L., Alonso de Robador, J.M., Pintos, B., Gómez-Garay, A. (2019). First report of *Fusarium equiseti* causing vascular wilt disease on *Vitis vinifera* L. in Spain. *Plant Disease*, 103(9), 2471.
- Azevedo-Meleiro, C.H., Rodríguez-Amaya, D.B. (2007). Qualitative and quantitative differences in carotenoid composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita pepo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4027-4033.
- Babadoost, M., Zitter, T.A. (2009). Fruit rots of pumpkin: A serious threat to the pumpkin industry. *Plant Disease*, 93(8), 772-782.
- Babai-Ahary, A., Abrinnia, M., Heravan, I.M. (2004). Identification and pathogenicity of *Pythium* species causing damping-off in sugarbeet in northwest Iran. *Australasian Plant Pathology*, 33(3), 343-347.
- Bailly, A., Weiskopf, L. (2012). The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: current knowledge and future challenges. *Plant Signaling & Behavior*, 7(1), 79-85.
- Balodi, R., Bisht, S., Ghatak, A., Rao, K.H. (2017). Plant disease diagnosis: Technological advancements and challenges. *Indian Phytopathology*, 70(3), 275-281.
- Banach, J.L., Sampers, I., Van Haute, S., van der Fels-Klerx, H.J. (2015). Effect of disinfectants on preventing the cross-contamination of pathogens in fresh produce washing water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 8658-8677.
- Barkai-Golan, R. (2005). Postharvest diseases of fruits and vegetables. Elsevier Science.
- Barth, M., Hankinson, T.R., Zhuang, H., Breidt, F. (2009). Microbiological spoilage of fruits and vegetables En O. Erkmen y T. F. Bozoglu (Eds.), *Food Microbiology: Principles into Practice* (pp. 135-183). John Wiley & Sons, Ltd.
- Bartz, J.A., Eckert, J.W. (1987). Bacterial diseases of vegetable crops after harvest. En J. Weichmann (Ed.), *Postharvest Physiology of Vegetables*. Food Science and Technology (Marcel Dekker, Inc.), New York.

- Bashyal, B.M., Yadav, J., Gupta, A.K., Aggarwal, R. (2019). Understanding the secondary metabolite production of *Gibberella fujikuroi* species complex in genomic era. *Indian Phytopathology*, 72(2), 607-617.
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Recuperado el 1 de mayo de 2021 de <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Baswal, A.K., Ramezani, A. (2021). 1-methylcyclopropene potentials in maintaining the postharvest quality of fruits, vegetables, and ornamentals: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1), e15129.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Díaz-Pérez, J.C., Cano-Ochoa, C.F. (2000). Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of 'ciruela' fruit (*Spondias purpurea* L.) during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 20(1), 99-106.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2), 108-118.
- Bautista-Baños, S., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L.L. (2014). *Rhizopus stolonifer* (Soft Rot). En S. Bautista-Baños (Ed.), *Postharvest Decay. Control Strategies* (pp. 1-44). Elsevier Academic Press.
- Becker, B.R., Fricke, B.A. (1996). Simulation of moisture loss and heat loads in refrigerated storage of fruits and vegetables. *Science et Technique du Froid*, 6, 210-221.
- Belbahri, L., Calmin, G., Sánchez-Hernandez, E., Oszako, T., Lefort, F. (2006). *Pythium sterilum* sp. nov. isolated from Poland, Spain and France: its morphology and molecular phylogenetic position. *FEMS Microbiology Letters*, 255(2), 209-214.
- Bodbodak, S., Moshfeghifar, M. (2016). Advances in modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. En M.W. Siddiqui (Ed.), *Eco-Friendly Technology for Postharvest Produce Quality* (pp. 127-183). Elsevier Academic Press.

- Boesewinkel, H.J. (1976). Storage of fungal cultures in water. *Transactions of the British Mycological Society*, 66, 183-185.
- Boratyn, G.M., Camacho, C., Cooper, P.S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., ... Zaretskaya, I. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 41, 29-33.
- Borrero, C., Capote, N., Gallardo, M.A., Avilés, M. (2019). First report of vascular wilt caused by *Fusarium proliferatum* on strawberry in Spain. *Plant Disease*, 103(3), 581.
- Botondi, R., Barone, M., Grasso, C. (2021). A review into de effectiveness of ozone technology for improving the safety and preserving the quality of fresh-cut fruits and vegetables. *Foods*, 10, 748.
- Boyhan, G.E., MacLean, D., Bateman, A.G., Tate, S. (2012). Preliminary evaluation of modified-atmosphere storage for pumpkins. *International Journal of Vegetable Science*, 18(1), 87-92.
- Bugnicourt, F. (1952). Une espèce fusarienne nouvelle, parasite du riz. *Revue Générale de Botanique*, 59, 13-18.
- Burdsall, H.H., Dorworth, E.B. (1994). Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia*, 86(2), 275-280.
- Canaday, C.H. (1992). Effect of nitrogen fertilization on bacterial soft rot in two broccoli cultivars, one resistant and one susceptible to the disease. *Plant Disease*, 76, 989-991.
- CARM: Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Estadística Agraria de Murcia (2020). Recuperado el 30 de octubre de 2021 de [https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=2589&IDTIPO=100&RASTRO=c1415\\$m1174](https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=2589&IDTIPO=100&RASTRO=c1415$m1174)
- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J.J., Chiquito-Contreras, R.G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C.R., Hernandez-Montiel, L.G. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. *Agronomy*, 9(3), 121.

- Carvalho, L.M.J., Gomes, P.B., Oliveira Godoy, R.L., Pacheco, S., Monte, P.H.F., Carvalho, J.L.V., ... Neves, A.C.L. (2012). Total carotenoid content,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International*, 47(2), 337-340.
- Castellá, G., Cabañes, F.J. (2014). Phylogenetic diversity of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex isolated from Spanish wheat. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(2), 309-317.
- Castellani, A. (1939). The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42, 225-226.
- Caten, C.E., Jinks, J.L. (1968). Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. *Journal of Botany*, 46, 329-348.
- Cenis, J.L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20(9), 2380.
- Chaiharn, M., Chunnaleuchanon, S., Lumyong, S. (2009). Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1919-1928.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B.N., Basnet, M., Chakraborty, A.P. (2009). Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 625-634.
- Champaco, E.R., Martyn, R.D., Miller, M.E. (1993). Comparison of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* as causal agents of fruit rot and root rot of muskmelon. *HortScience*, 28(12), 1174-1177.
- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., Basak, T. (2013). Microwave food processing-A review. *Food Research International*, 52(1), 243-261.
- Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Reddy, K.R.N., Abbasi, S. (2011). Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(4), 341-351.

- Choi, J.-H., Lee, S., Nah, J.-Y., Kim, H.-K., Paek, J.-S., Lee, S., ... Lee, T. (2018). Species composition of and fumosin production by the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from Korean cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 267, 62-69.
- Civello, P.M., Vicente, A.R., Martínez, G.A. (2006). UV-C technology to control postharvest diseases of fruits and vegetables. En R. Troncoso-Rojas, M.E. Tiznado-Hernández y A. González-León (Eds.), *Recent Advances in Alternative Postharvest Technologies to Control Fungal Diseases in Fruit & Vegetables* (pp. 71-102) Transworld Research Network.
- Coates, L.M., Johnson, G.I., Dale, M. (1997). Postharvest pathology of fruit and vegetables. En J. Brown y H. Ogle (Eds.), *Plant pathogens and plant diseases* (pp. 533-547). Rockvale Publications.
- Coleman, J.J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*, 17(2), 146-158.
- Conti, S., Villari, G., Amico, E., Caruso, G. (2015). Effects of production system and transplanting time on yield, quality and antioxidant content of organic winter squash (*Cucurbita moschata* Duch.). *Scientia Horticulturae*, 183, 136-143.
- Cote, S., Rodoni, L., Miceli, E., Concellón, A., Civello, P.M., Vicente, A.R. (2013). Effect of radiation intensity on the outcome of postharvest UV-C treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 83, 83-89.
- Dakin, J.C., Tampion, J. (1968). Specific fungi as the causative agents of the sporadic disintegration of sulphited strawberries. *International Journal of Food Science and Technology*, 3(1), 39-48.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., ... Foster, G.D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430.
- De Corato, U., Salimbeni, R., De Pretis, A. (2018). Evaluation of an alternative mean for controlling postharvest *Rhizopus* rot of strawberries. *Advances in Horticultural Science*, 32(3), 325-334

- De Escalada Pla, M.F., Ponce, N.M., Stortz, C.A., Gerschenson, L.N., Rojas, A.M. (2007). Composition and functional properties of enriched fiber products obtained from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret). *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1176-1185.
- Deliopoulos, T., Kettlewell, P.S., Hare, M.C. (2010). Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Protection*, 29(10), 1059-1075.
- Dell'Erba, A., Falsanisi, D., Liberti, L., Notarnicola, M., Santoro, D. (2007). Disinfection by-products formation during wastewater disinfection with peracetic acid. *Desalination*, 215(1-3), 177-186.
- Dennis, C., Blijham, J.M. (1980). Effect of temperature on viability of sporangiospores of *Rhizopus* and *Mucor* species. *Transactions of the British Mycological Society*, 74(1), 89-94.
- Dhaouadi, S., Rouissi, W., Mougou-Hamdane, A., Nasraoui, B. (2019). Evaluation of biocontrol potential of *Achromobacter xylosoxidans* against Fusarium wilt of melon. *European Journal of Plant Pathology*, 154, 179-188.
- Diáñez, F., Santos, M., Blanco, R., Tello, J.C. (2002). Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry crops in Huelva (southwestern Spain). *Phytoparasitica*, 30(5), 529-534.
- Drechsler, C. (1960). Two root rot fungi closely related to *Pythium ultimum*. *Sydowia - An International Journal of Mycology*, 14, 106-115.
- Drenth, A., Sendall, B. (2001). *Practical guide to detection and identification of Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection Brisbane Australia.
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., Jijakli, M.H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22-29.
- Droby, S., Wisniewski, M. (2018). The fruit microbiome: A new frontier for postharvest biocontrol and postharvest biology. *Postharvest Biology and Technology*, 140, 107-112.



- Duarte-Sierra, A., Nadeau, F., Angers, P., Michaud, D., Arul, J. (2019). UV-C hormesis in broccoli florets: Preservation, phyto-compounds and gene expression. *Postharvest Biology and Technology*, *157*, 110965.
- Duarte-Sierra, A., Hasan, S.M.M., Angers, P., Arul, J. (2020). UV-B radiation hormesis in broccoli florets: Glucosinolates and hydroxy-cinnamates are enhanced by UV-B in florets during storage. *Postharvest Biology and Technology*, *168*, 111278.
- Dunlap, J.R., Lingle, S.E., Lester, G.E. (1990). Ethylene production in netted muskmelon subjected to postharvest heating and refrigerated storage. *HortScience*, *25*(2), 207-209.
- Eggertson, Q. (2012). Resolving the *Pythium ultimum* species complex [Tesis de Doctorado, Carleton University Ottawa, Ontario]. Repositorio Institucional-CURVE (Carleton University Research Virtual Environment).
- Elegado, F.B., Fujio, Y. (1993). Polygalacturonase production by *Rhizopus* spp. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *39*, 409-418.
- El-Ghaouth, A. (1997). Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *19*(3), 160-162.
- Emmanuel, C.J., Deluxeani, K., Sevel, P. (2021). Fruit rot of butternut squash (*Cucurbita moschata* Duch.) caused by *Choanephora cucurbitarum* in Sri Lanka. *Indian Phytopathology*, *74*(2), 851-854.
- Erasmus, A., Lennox, C.L., Korsten, L., Lesar, K., Fourie, P.H. (2015). Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mold: Impact and options. *Postharvest Biology and Technology*, *107*, 66-76.
- Erper, I., Ozer, G., Zholdosbekova, S., Turkkan, M. (2020). First report of garden cucumber root caused by *Globisporangium ultimum* var. *ultimum* in Kyrgyzstan. *Journal of Plant Pathology*, *102*(3), 1363-1364.
- Esan, A.O., Fapohunda, S.O., Ezekiel, C.N., Sulyok, M., Krska, R. (2020). Distribution of fungi and their toxic metabolites in melon and sesame seeds marketed in two major producing states in Nigeria. *Mycotoxin Research*, *36*(4), 361-369.

- Fallik, E. (2004). Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). *Postharvest Biology and Technology*, 32(2), 125-134.
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT, Cultivos y productos de ganadería (2019). Recuperado el 30 de octubre de 2021 de <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Feliziani, E., Romanazzi, G. (2013). Preharvest application of synthetic fungicides and alternative treatments to control postharvest decay of fruit. *Stewart Postharvest Review*, 3(3), 1-6.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- FEPEX: Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas Vivas (2020). Recuperado el 07 de noviembre de 2021 de <https://www.fepex.es/datos-del-sector/exportacion-importacion-esp%C3%B1ola-frutas-hortalizas>
- Fernández-León, M.F., Fernández-León, A.M., Lozano, M., Ayuso, M.C., González-Gómez, D. (2013). Different postharvest strategies to preserve broccoli quality during storage and shelf life: Controlled atmosphere and 1-MCP. *Food Chemistry*, 138(1), 564-573.
- Ferrari, C.C., Sarantópoulos, C.I.G.L., Carmello-Guerreiro, S.M., Hubinger, M.D. (2013). Effect of osmotic dehydration and pectin edible coatings on quality and shelf life of fresh-cut melon. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 80-91.
- Filho, F.O., Silva, E.dO., Lopes, M.M.dA., Ribeiro, P.R.V., Oster, A.H., Guedes, J.A.C., ... Zocolo, G.J. (2020). Effect of pulsed light on postharvest disease control-related metabolomic variation in melon (*Cucumis melo*) artificially inoculated with *Fusarium pallidoroseum*. *PLoS ONE*, 15(4), e0220097.
- Fox, R.T.V. (1993). *Principles of diagnostic techniques in plant pathology*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

- Gálvez, L., Urbaniak, M., Waskiewicz, A., Stepien, L., Palmero, D. (2017). *Fusarium proliferatum* - causal agent of garlic bulb rot in Spain: Genetic variability and mycotoxin production. *Food Microbiology*, 67, 41-48.
- García-Arenal, F., Fraile, A. (2000). La patología vegetal: Ciencia y tierra. En: *Patología Vegetal*. (Vol. 1, pp. 25-33). Phytoma, Mundi-Prensa.
- García-Robles, J.M., Quintero-Ibarra, M., Mercado-Ruiz, J.N., Báez-Sañudo, R. (2016). Conservación postcosecha de melón cantaloupe mediante el uso de cera comestible y 1-metilciclopropeno. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 17(1), 79-85.
- Ghadiri, M.R., Dalili, A., Frotan, A., Zaker, M., Rahmanifard, B., Dalili, M. (2013). Study on antifungal activity of some salts on growth and dry rot development of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 13(5), 668-672.
- Gómez, J., Guerra-Sanz, J.M., Sánchez-Guerrero, M.C., Serrano, Y., Melero-Vara, J.M. (2008). Crown rot of zucchini squash caused by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* in Almería Province, Spain. *Plant Disease*, 92(7), 1137.
- Gómez, J., Serrano, Y., Pérez, A., Porcel, E., Gómez, R., Aguilar, M.I. (2014). *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*, affecting melon in Almería Province, Spain. *Australasian Plant Disease Notes*, 9(1), 136.
- González, V., García-Martínez, S., Flores-León, A., Ruiz, J.J., Picó, B., Garcés-Claver, A. (2020a). *Neocosmospora keratoplastica*, a relevant human fusarial pathogen is found to be associated with wilt and root rot of Muskmelon and Watermelon crops in Spain: epidemiological and molecular evidences. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 1189-1196.
- González, V., García-Martínez, S., Ruiz, J.J., Flores-León, A., Picó, B., Garcés-Claver, A. (2020b). First report of *Neocosmospora falciformis* causing wilt and root rot of Muskmelon in Spain. *Plant Disease*, 104, 4.
- González, V., Armijos, E., Garcés-Claver, A. (2020c). Fungal endophytes as biocontrol agents against the main soil-borne diseases of melon and watermelon in Spain. *Agronomy*, 10(6), 820.

- Goyette, B., Charles, M.T., Vigneault, C., Raghavan, G.S.V. (2007). Pressure treatment for increasing fruit and vegetable qualities. *Stewart Postharvest Review*, 3(5), 1-6.
- Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R.J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry*, 39(8), 1968-1977.
- Gryganskyi, A.P., Lee, S.C., Litvintseva, A.P., Smith, M.E., Bonito, G., Porter, T.M., ... Vilgalys, R. (2010). Structure, function, and phylogeny of the mating locus in the *Rhizopus oryzae* complex. *PLoS ONE*, 5(12), e15273.
- Gryganskyi, A.P., Golan, J., Dolatabadi, S., Mondo, S., Robb, S., Idnurm, A., ... Stajich, J.E. (2018). Phylogenetic and phylogenomic definition of *Rhizopus* species. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(6), 2007-2018.
- Hall, B.G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229-1235.
- Hao, J., Wang, Q. (2019). Application of electrolyzed water in fruits and vegetables industry. En T. Ding, D.H. Oh y D. Liu. (Eds.), *Electrolyzed Water in Food: Fundamentals and Applications* (pp. 67-111). Springer, Singapore.
- Harris, J.E., Dennis, C. (1979). The stability of pectolytic enzymes in sulphite liquor in relation to breakdown of sulphited strawberries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30(7), 704-710.
- Harris, J.E., Dennis, C. (1980). Distribution of *Mucor piriformis*, *Rhizopus sexualis* and *R. stolonifer* in relation to their spoilage of strawberries. *Transactions of the British Mycological Society*, 75(3), 445-450.
- Hartanti, A.T., Rahayu, G., Hidayat, I. (2015). *Rhizopus* species from fresh tempeh collected from several regions in Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(3), 136-142.
- Harvey, W.J., Grant, D.G., Lammerink, J.P. (1997). Physical and sensory changes during the development and storage of buttercup squash. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 25(4), 341-351.

- Hashmi, M.S., East, A.R., Palmer, J.S., Heyes, J.A. (2013). Hypobaric treatment stimulates defence-related enzymes in strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, *85*, 77-82.
- Herrero, M.L., Blanco, R., Santos, M., Tello, J.C. (2002). First report of *Phytophthora capsici* on cucumber and melon in southeastern Spain. *Plant Disease*, *86*(5), 558.
- Heylen, K., Ettwig, K., Hu, Z., Jetten, M., Kartal, B. (2012). Rapid and simple cryopreservation of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(8), 3010-3013.
- Hildebrand, P.D. (1989). Surfactant-like characteristics and identity of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *11*, 205-214.
- Hoffmann, K., Pawlowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., de Hoog, G.S., Benny, G.L., Kirk, P.M., Voigt, K. (2013). The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *30*, 57-76.
- Holsteijn, F.v., Kemna, R. (2018). Minimizing food waste by improving storage conditions in household refrigeration. *Resources, Conservation & Recycling*, *128*, 25-31.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (9<sup>a</sup> ed). Lippincott Williams & Wilkins.
- Huali, X., Yaxuan, S., Lan, L., Yang, B., Raza, H., Rui, Z., ... Lumei, P. (2020). Acetylsalicylic acid (ASA) induced fusarium rot resistance and suppressed neosolaniol production by elevation of ROS metabolism in muskmelon fruit. *Scientia Horticulturae*, *265*, 109264.
- Huang, K., Zou, Y., Luo, J., Liu, Y. (2015). Combining UV-C treatment with biocontrol yeast to control postharvest decay of melon. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(18), 14307-14313.
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, *46*(3), 205-229.

- Hurst, P.L., Corrigan, V.K., Hannan, P.J., Lill, R.E. (1995). Storage rots, compositional analysis, and sensory quality of three cultivars of buttercup squash. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 23(1), 89-95.
- Image Tool (3.0) [Software] (2012). Recuperado de <https://imagetool.software.informer.com/3.0/>
- Ippolito, A., Mincuzzi, A., Surano, A., Youssef, K., Sanzani, S.M. (2021). Electrolyzed water as a potential agent for controlling postharvest decay of fruits and vegetables. En D. Spadaro, S. Droby y M.L. Gullino (Eds.), *Postharvest Pathology. Plant Pathology in the 21st Century* (Vol. 11, pp. 181-202). Springer, Cham.
- Jacobo-Valenzuela, N., Maróstica-Junior, M.R., Zazueta-Morales, J.J., Gallegos-Infante, J.A. (2011). Physicochemical, technological properties, and health-benefits of *Cucurbita moschata* Duchense vs. Cehualca: A Review. *Food Research International*, 44(9), 2587-2593.
- Ji, F., He, D., Olaniran, A.O., Mokoena, M.P., Xu, J., Shi, J. (2019). Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 1(6), 1-14.
- Jiang, Q., Zhang, M., Xu, B. (2020). Application of ultrasonic technology in postharvested fruits and vegetables storage: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 69, 105261.
- Jiménez-Reyes, M.F., Carrasco, H., Olea, A.F., Silva-Moreno, E. (2019). Natural compounds: A sustainable alternative to the phytopathogens control. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 64(2), 4459-4465.
- Kader, A. (2012). *Opportunities for international collaboration in postharvest education and extension activities*. VII International Postharvest Symposium (Vol. 1012, pp. 1363-1370).
- Kämpfer, P., Buczolits, S., Albrecht, A., Busse, H.-J., Stackebrandt, E. (2003). Towards a standardized format for the description of a novel species (of an established genus): *Ochrobactrum gallinifaecis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 893-896.

- Kazi, N., Chimbekujwo, I.B., Anjili, S.M. (2019a). Causal agents of post-harvest rot of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) and their control using indigenous practices in Hong, Adamawa State. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 3, 062-066.
- Kazi, N., Chimbekujwo, I.B., Anjili, S.M. (2019b). Identification and control of post-harvest rot of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) in Hong, Adamawa State. *African Journal of Plant Science*, 13(9), 239-245.
- Khan, N.T. (2017). MEGA - Core of phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 5(2), 1000183.
- Kim, J.-W., Kim, H.J. (2004). Fusarium fruit rot of postharvest oriental melon (*Cucumis melo* L. var. *makuwa* Mak.) caused by *Fusarium* spp. *Research in Plant Disease*, 10(4), 260-267.
- Kinay, P., Mansour, M.F., Gabler, F.M., Margosan, D.A., Smilanick, J.L. (2007). Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*, 26(4), 647-656.
- Kitis, M. (2004). Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International*, 30(1), 47-55.
- Kobayashi, Y., Tsukamoto, T., Saito, J., Sugimoto, S. (2004). Alternaria fruit rot of melon caused by *Alternaria alternata*. *Research Bulletin of the Plant Protection Japan*, 40, 153-155.
- Koike, S.T., Gladders, P., Paulus, A.O. (2007). *Vegetable diseases: A colour handbook*. Academic Press, USA.
- Kubota, M., Tezuka, N., Abiko, K., Ishii, M. (1995). *Pythium* rot of broccoli caused by *Pythium ultimum* Trow var. *ultimum*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 61(5), 503-506.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549.

- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4), 331-371.
- Kurtzman, C.P. (2014). Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 325-332.
- Kwon, J.H., Kang, S.W., Park, C.S. (2000). Occurrence of *Rhizopus* soft rot on squash (*Cucurbita moschata*) caused by *Rhizopus stolonifer* in Korea. *Plant Pathology Journal*, 16(6), 321-324.
- Kwon, J.H., Kim, J., Lee, Y.H., Shim, H.S. (2010). Soft rot on *Cucumis melo* var. *makuwa* caused by *Rhizopus oryzae*. *Mycobiology*, 38(4), 336-338.
- Kwon, J.H., Ryu, J.S., Chi, T.T.P., Shen, S.S., Choi, O. (2012). Soft rot of *Rhizopus oryzae* as a postharvest pathogen of banana fruit in Korea. *Mycobiology*, 40(3), 214-216.
- Kwon, J.H., Kang, D.W., Lee, S.D., Kim, J. (2014). Outbreak of *Rhizopus* rot caused by *Rhizopus oryzae* on seedlings of grafted cucumber on pumpkin rootstock in south Korea. *Journal of Phytopathology*, 163(7-8), 670-674.
- Laraba, I., McCormick, S.P., Vaughan, M.M., Geiser, D.M., O'Donnell, K. (2021). Phylogenetic diversity, trichothecene potential, and pathogenicity within *Fusarium sambucinum* species complex. *PLoS ONE*, 16(1), e0245037.
- Larkin, R.P., English, J.T., Mihail, J.D. (1995). Effects of infection by *Pythium* spp. on root system morphology of alfalfa seedlings. *Phytopathology*, 85, 430-435.
- Lebuhn, M., Achouak, W., Schloter, M., Berge, O., Meier, H., Barakat, M., Hartmann, A., Heulin, T. (2000). Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2207-2223.
- Lemoine, M.L., Civello, P.M., Martínez, G.A., Chaves, A.R. (2007). Influence of postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed



- broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 1132-1139.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. (1<sup>st</sup> ed.). Blackwell Publishing Ltd., Ames, Iowa, USA.
- Lévesque, C.A., Brouwer, H., Cano, L., Hamilton, J.P., Holt, C., Huitema, E., ... Buell, C.R. (2010). Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biology*, 11, R73. <http://genomebiology.com/2010/11/7/R73>
- Li, B.-J., Liu, Y., Shi, Y.-X., Xie, X.-W., Guo, Y.-L. (2010). First report of crown rot of grafted cucumber caused by *Fusarium solani* in China. *Plant Disease*, 94(11), 1377.
- Li, Y.G., Zhang, R., Meng, L., Ali, E., Ji, P., Zhang, Q.F., Ding, G.Z., Cui, G.W. (2019). Occurrence of fruit rot of cantaloupe caused by *Fusarium equiseti* in China. *Plant Disease*, 103(10), 2683.
- Li, J., Zhang, Y. (2020). Biological characteristics and isolation of *Pythium ultimum* causing rot of Chinese cabbage. *Australasian Plant Pathology*, 49(2), 201-207.
- Liamnimitr, N., Thammawong, M., Nakano, K. (2018). Application of pressure treatment for quality control in fresh fruits and vegetables. *Reviews in Agricultural Science*, 6, 34-45.
- Lima, G., De Curtis, F., De Cicco, V. (2008). Interaction of microbial biocontrol agents and fungicides in the control of postharvest diseases. *Stewart Postharvest Review*, 1(4), 1-7.
- Lima, G.P.P., Machado, T.M., de Oliveira, L.M., da Silva Borges, L., de Albuquerque Pedrosa, V., Vanzani, P., Vianello, F. (2014). Ozonated water and chlorine effects on the antioxidant properties of organic and conventional broccoli during postharvest. *Scientia Agricola*, 71(2), 151-156.
- Lima, E.N., Oster, A.H., Bordallo, P.N., Araújo, A.A.C., Silva, D.E.M., Lima, C.S. (2021). A novel lineage in the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex is one of the causal agents of fusarium rot on melon fruits in Northeast Brazil. *Plant Pathology*, 70(1), 133-143.

- Lin, F., Xue, Y., Huang, Z., Jiang, M., Lu, F., Bie, X., Miao, S., Lu, Z. (2019). Bacillomycin D inhibits growth of *Rhizopus stolonifer* and induces defense-related mechanism in cherry tomato. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 7663-7674.
- Liou, G.-Y., Chen, S.-R., Wei, Y.-H., Lee, F.-L., Fu, H.-M., Yuan, G.-F., Stalpers, J.A. (2007). Polyphasic approach to the taxonomy of the *Rhizopus stolonifer* group. *Mycological Research*, III (2), 196-203.
- Liplap, P., Toussaint, V., Toivonen, P., Vigneault, C., Boutin, J., Raghavan, G.S.V. (2014). Effect of hyperbaric pressure treatment on the growth and physiology of bacteria that cause decay in fruit and vegetables. *Food and Bioprocess Technology*, 7(8), 2267-2280.
- Liu, X.-Y., Huang, H., Zheng, R.-Y. (2007). Molecular phylogenetic relationships within *Rhizopus* based on combined analyses of ITS rDNA and *pyrG* gene sequences. *Sydowia - An International Journal of Mycology*, 59(2), 235-253.
- Liu, D.-K., Xu, C.-C., Guo, C.-X., Zhang, X.-X. (2020). Sub-zero temperature preservation of fruits and vegetables: A review. *Journal of Food Engineering*, 275(4), 109881.
- Lombard, L., van der Merwe, N.A., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. (2015). Genetic concepts in *Nectriaceae*. *Studies in Micology*, 80, 189-245.
- López, M.M., Llop, P., Olmos, A., Marco-Noales, E., Cambra, M., Bertolini, E. (2009). Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses?. Current Issues in *Molecular Biology*, 11(1), 13-46.
- Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 14(9), 257-269.
- Lurie, S., Pedreschi, R. (2014). Fundamental aspects of postharvest heat treatments. *Horticulture Research*, 1(1), 14030.
- Lyons-Weiler, J., Hoelzer, G.A., Tausch, R.J. (1998). Optimal outgroup analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 64(4), 493-511.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. (12ª ed.). PEARSON, Addison Weley.

- Mahdikhani, M., Davoodi, A. (2016). Evaluation of biocontrol potential of rhizosphere antagonist bacterial strains on *Fusarium* wilt and plant growth in muskmelon plants. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 10(6), 15-23.
- Manganiello, G., Pane, C. (2021). First report of *Globisporangium ultimum* causing damping-off of wild rocket seedlings. *Journal of Plant Pathology*, 103, 721.
- MAPAMA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Superficies y producciones de cultivos. Hortalizas de fruto-melón: Análisis provincial de superficie, rendimiento y producción (2018). Recuperado el 15 de octubre de 2021 [https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2019/CAPITULOSPDF/CAPITULO07/pdfc07\\_6.21.3.pdf](https://www.mapa.gob.es/estadistica/pags/anuario/2019/CAPITULOSPDF/CAPITULO07/pdfc07_6.21.3.pdf)
- MAPAMA: Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de estadísticas agrarias (2020). Recuperado el 30 de octubre de 2021 de <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2020/default.aspx?parte=3>
- MAPAMA: Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Registro de Productos Fitosanitarios (2021). Recuperado el 6 de octubre de 2021 de <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/fitos.asp>
- Mari, M., Di Francesco, A., Bertoloni, P. (2014). Control of fruit postharvest diseases: old issues and innovative approaches. *Stewart Postharvest Review*, 1(1), 1-4.
- Mari, M., Bautista-Baños, S., Sivakumar, D. (2016). Decay control in the postharvest system: Role of microbial and plant volatile organic compounds. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 70-81.
- Marín, P., Moretti, A., Ritieni, A., Jurado, M., Vázquez, C., González-Jaén, M.T. (2012). Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. *Food Microbiology*, 31(2), 229-237.
- Marra, F., Zhang, L., Lyng, J.G. (2009). Radio frequency treatment of foods: Review of recent advances. *Journal of Food Engineering*, 91(4), 497-508

- Martin, F.N., Loper, J.E. (1999). Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: Ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(2), 111-181.
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., ... Dandekar, A.M. (2015). Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 1-25.
- Martínez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., Fermaud, M. (2003a). Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(5), 479-488.
- Martínez, R., Aguilar, M.I., Guirado, M.L., Álvarez, A., Gómez, J. (2003b). First report of fusarium wilt of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* in Spain. *Plant Pathology*, 52(3), 410.
- Martínez, J.A., Navarro, A., Fernández, J.A., Bañón, S. (2007). Using paclobutrazol to delay the growth of *Botrytis cinerea* isolated from *Chamelaucium uncinatum*. *Australasian Plant Pathology*, 36, 39-45.
- Martínez, J.A., Jowkar, M.M., Obando-Ulloa, J.M., Varó, P., Moreno, E., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. (2009). Uncommon disorders and decay in near-isogenic lines of melon and reference cultivars. *Horticultura Brasileira*, 27(4), 505-514.
- Martínez, J.A., Parra, M.A. (2017). FITOLAB, una plataforma de transferencia de tecnología al servicio de las empresas. *Revista Eubacteria*, 38, 43-48.
- Matsumoto, C., Kageyama, K., Suga, H., Hyakumachi, M. (1999). Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. *Mycoscience*, 40(4), 321-331.
- Medeiros Araújo, M.B., Moreira, G.M., Nascimento, LV., de Almeida Nogueira, G., de C. Nascimento, S.R., Pfenning, L.H., de Q. Ambrósio, M.M. (2020). Fusarium rot of melon is caused by several *Fusarium* species. *Plant Pathology*, 70(3), 712-721.
- MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (X) [Software] (2018). Recuperado de <https://www.megasoftware.net/>

- Mercantilia. (1989). *Guide to Food Transport: Fruit and Vegetables* (pp. 247). Mercantilia Publishers, Copenhagen.
- Miller, P.M. (1955). V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology*, 45, 461-462.
- Miller, J.N. y Miller, J.C. (1993). *Estadística para química analítica*. Addison-Wesley Iberoamericana.
- Mirhosseini, H.A., Babaeizad, V., Hashemi, L. (2014). First report of *Fusarium brachigibbosum* causing leaf spot on oleander in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 96(2), 431-439.
- Misiou, O., Koutsoumanis, K. (2021). Climate change and its implications for food safety and spoilage. *Trends in Food Science & Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.031>
- Morales-Cedeño, L.R., Orozco-Mosqueda, M.C., Loeza-Lara, P.D., Parra-Cota, F.I., de los Santos-Villalobos, S., Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research*, 242, 126612.
- Moumni, M., Mancini, V., Allagui, M.B., Murolo, S., Romanazzi, G. (2019). Black rot of squash (*Cucurbita moschata*) caused by *Stagonosporopsis cucurbitacearum* reported in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 58(2), 379-383.
- Munkvold, G.P. (2017). *Fusarium* species and their associated mycotoxins. *Methods in Molecular Biology*, 1542, 51-106.
- Nabi, S.U., Raja, W.H., Kumawat, K.L., Mir, J.I., Sharma, O.C., Singh, D.B., Sheikh, M.A. (2017). Post harvest diseases of temperature fruits and their management strategies-a review. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5(3), 885-898.
- Nair, M.S., Tomar, M., Punia, S., Kukula-Koch, W., Kumar, M. (2020). Enhancing the functionality of chitosan- and alginate-based active edible coatings/films for the

- preservation of fruits and vegetables: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 304-320.
- Nakasone, K.K., Peterson, S.W., Jong, S.C. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. En G.M. Mueller, G.F. Bills y M.S. Foster (Eds.), *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods* (pp. 37-47). Elsevier Academic Press.
- Navi, S.S., Huynh, T., Mayers, C.G., Yang, X.B. (2019). Diversity of *Pythium* spp. associated with soybean damping-off, and management implications by using foliar fungicides as seed treatments. *Phytopathology Research*, 1(1), 8.
- NCBI: National Center for Biotechnology Information (2021). Recuperado el 1 de mayo de 2021 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium species: An illustrated manual for identification* (pp. 193). Pennsylvania State University Press, University Park.
- Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D., Desjardins, A.E. (1992). Fumonisin B<sub>1</sub> production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3), 984-989.
- Newmeyer, D. (1990). Filtering small quantities of conidial suspensions to remove mycelial fragments. *Fungal Genetics Reports*, 37(15).
- Ning, M., Tang, F., Zhang, Q., Zhao, X., Yang, L., Cai, W., Shan, C. (2019). Effects of *Penicillium* infection on the expression and activity of CDPK2 in postharvest Hami melon treated with calcium chloride. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106(8), 175-181.
- Nuangmek, W., Aiduang, W., Suwannarach, N., Kumla, J., Kiatsiriroat, T., Lumyong, S. (2019). First report of fruit rot on cantaloupe caused by *Fusarium equiseti* in Thailand. *Journal of General Plant Pathology*, 85(4), 295-300.
- Nunes, C.A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, 133, 181-196.

- O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. En D.R. Reynolds y J.W. Taylor (Eds.), *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Nirenberg, H.I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3): 465-493.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M.G., Brandt, M.E., Zhang, N., Geiser, D.M. (2008). Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2477-2490.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Sarver, B.A.J., Balajee, S.A., Schroers, H.-J., ... Geiser, D.M. (2010). Internet-accessible DNA sequence database for identifying *Fusaria* from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3708-3718.
- O'Donnell, K., Al-Hatmi, A.M.S., Aoki, T., Brankovics, B., Cano-Lira, J.F., Coleman, J.J., ... Zhang, S.X. (2020). No to *Neocosmospora*: Phylogenomic and practical reasons for continued inclusion of the *Fusarium solani* species complex in the genus *Fusarium*. *Ecological and Evolutionary Science*, 5(5), 1-7.
- Oliveira, M.J., Laranjeira, D., Saraiva Câmara, M.P., Ferraz Laranjeira, F., Armengol, J., Michereff, S.J. (2014). Effects of wounding, humidity, temperature, and inoculum concentrations on the severity of corky dry rot caused by *Fusarium semitectum* in melon fruits. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 36(3), 281-289.
- Palou, L., Ali, A., Fallik, E., Romanazzi, G. (2016). GRAS, plant- and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 41-52.
- Palou, L. (2018). Postharvest treatments with GRAS salts to control fresh fruit decay. *Horticulturae*, 4(46), 1-15.
- Palou, L., Pérez-Gago, M.B. (2021). GRAS salts as alternative low-toxicity chemicals for postharvest preservation of fresh horticultural products. En D. Spadaro, S. Droby

- y M.L. Gullino (Eds.), *Postharvest Pathology. Plant Pathology in the 21st Century* (Vol. 11, pp. 163-179). Springer, Cham.
- Pan, J., Vicente, A.R., Martínez, G.A., Chaves, A.R., Civello, P.M. (2004). Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(14), 1831-1838.
- Panahirad, S., Dadpour, M., Peighambardoust, S.H., Soltanzadeh, M., Gullón, B., Alirezalu, K., Lorenzo, J.M. (2021). Applications of carboxymethyl cellulose- and pectin-based active edible coatings in preservation of fruits and vegetables: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 110(4), 663-673.
- Parikka, P., Hakala, K., Tiilikkala, K. (2012). Expected shifts in *Fusarium* species' composition on cereal grain in northern Europe due to climatic change. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29, 1543-1555.
- Park, M.-H., Chang, E.-H., Yang, H.-J., Lee, J.-S., Do, G.-R., Song, H.J., Chang, M.-S., Ku, K.-M. (2020). Modified atmosphere and humidity film reduces browning susceptibility of oriental melon suture tissue during cold storage. *Foods*, 9(9), 1329.
- Parle, M., Singh, K. (2011). Musk melon is eat-must melon. *International Research Journal of Pharmacy*, 2(8), 52-57.
- Parveen, Z., Masud, S.Z. (2002). Fungicide residues in apple and citrus fruits after post harvest treatment. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 45(4), 246-249.
- Patel, A., Kumar, A., Sheoran, N., Kumar, M., Sahu, K.P., Ganeshan, P., ... Gogoi, R. (2021). Antifungal and defense elicitor activities of pyrazines identified in endophytic *Pseudomonas putida* BP25 against fungal blast incited by *Magnaporthe oryzae* in rice. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(1), 261-272.
- Paull, R.E., Chen, N.J. (2000). Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 21(1), 21-37.
- Paulsen, E., Barrios, S., Baenas, N., Moreno, D.A., Heinzen, H., Lema, P. (2018). Effect of temperature on glucosinolate content and shelf life of ready-to-eat broccoli



- florets packaged in passive modified atmosphere. *Postharvest Biology and Technology*, 138(4), 125-133.
- Pérez-Hernández, A., Porcel-Rodríguez, E., Gómez-Vázquez, J. (2017). Survival of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* and fungicide application, soil solarization, and biosolarization for control of crown and foot rot of zucchini squash. *Plant Disease*, 101(8), 1507-1514.
- Pérez-Hernández, A., Rocha, L.O., Porcel-Rodríguez, E., Summerell, B.A., Liew, E.C.Y., Gómez-Vázquez, J.M. (2020). Pathogenic, morphological, and phylogenetic characterization of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* isolates from cucurbits in Almería Province, Spain. *Plant Disease*, 104(5), 1465-1476.
- Perini, M.A., Sin, I.N., Reyes-Lara, A.M., Gómez-Lobato, M.E., Civello, P.M., Martínez, G.A. (2017). Hot water treatments performed in the base of the broccoli stem reduce postharvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L. Var *italica*) heads stored at 20 °C. *LWT-Food Science and Technology*, 77(3), 314-322.
- Pétriacq, P., López, A., Luna, E. (2018). Fruit decay to diseases: Can induced resistance and priming help? *Plants*, 7(77), 1-16.
- Pettitt, T.R., Wakeham, A.J., Wainwright, M.F., White, J.G. (2002). Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water. *Plant Pathology*, 51(6), 720-727.
- Pizato, S., dos Santos, B.M.M., Santiago, N.G., Chevalier, R.C., Pinedo, R.A., Cortez-Vega, W.R. (2020). Use of chitosan and xanthan gums to extend the shelf life of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* L. *Italica*). *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 12(1), 157-167.
- Pornsuriya, C., Chitphithak, I. (2018). Blue mold by *Penicillium oxalicum* on muskmelon (*Cucumis melo*) in Thailand. *Australasian Plant Disease Notes*, 13(1), 46.
- Portela, S.I., Cantwell, M.I. (1998). Quality changes of minimally processed honeydew melons stored in air or controlled atmosphere. *Postharvest Biology and Technology*, 14(3), 351-357.

- Priyanka, R., Nakkeeran, S. (2019). *Ochrobactrum ciceri* mediated induction of defence genes and antifungal metabolites enhance the biocontrol efficacy for the management of *Botrytis* leaf blight of *Lilium* under protected conditions. *Journal of Plant Pathology*, 101(10), 323-337.
- Proexport: Asociación de Productores-Exportadores de Frutas y Hortalizas de la Región de Murcia (2021). Recuperado el 07 de noviembre de 2021 de <https://www.proexport.es/por-que-espana-es-la-huerta-de-europa/>
- Promwee, A., Yenjit, P., Issarakraisila, M., Intana, W., Chamswarng, C. (2017). Efficacy of indigenous *Trichoderma harzianum* in controlling *Phytophthora* leaf fall (*Phytophthora palmivora*) in Thai rubber trees. *Journal of Plant Disease and Protection*, 124(1), 41-50.
- Prusky, D. (1996). Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), 413-434.
- Prusky, D., Lichter, A. (2008). Mechanisms modulating fungal attack in post-harvest pathogen interactions and their control. *European Journal of Plant Pathology*, 121(3), 281-289.
- Putnam, M.L. (1995). Evaluation of selected methods of plant disease diagnosis. *Crop Protection*, 14(6), 517-525.
- Qing, F., Shiping, T. (2000). Postharvest biological control of Rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. *Plant Disease*, 84(11), 1212-1216.
- Rabaaoui, A., Dall'Asta, C., Righetti, L., Susca, A., Logrieco, A.F., Namsi, A., ... Masiello, M. (2021). Phylogeny and mycotoxin profile of pathogenic *Fusarium* species isolated from sudden decline syndrome and leaf wilt symptoms on date palms (*Phoenix dactylifera*) in Tunisia. *Toxins*, 13(7), 463.
- Rachitha, P., Krupashree, K., Jayashree, G.V., Gopalan, N., Khanum, F. (2017). Growth inhibition and morphological alteration of *Fusarium sporotrichiodes* by *Mentha piperita* essential oil. *Pharmacognosy Research*, 9(1), 74-79.
- Raeder, U., Broda, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1, 17-20.

- Rahman, M.A., Miaruddin, M., Khan, M.H.H., Masud, M.A.T., Begum, M.M. (2013). Effect of storage periods on postharvest quality of pumpkin. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 38(2), 247-255.
- Rahman, S.M.E., Khan, I., Oh, D.-H. (2016). Electrolyzed water as a novel sanitizer in the food industry: Current trends and future perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(3), 471-490.
- Ramdial, H., Latchoo, R.K., Hosein, F.N., Rampersad, S.N. (2017). Phylogeny and haplotype analysis of fungi within the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. *Phytopathology*, 107(1), 109-120.
- Ramos-García, M., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L.L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejagal, I., Estrada-Carrillo, M. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(1), 44-57.
- Ramos-García, M., Bosquez-Molina, E., Hernández-Romano, J., Zavala-Padilla, G., Terrés-Rojas, E., Alia-Tejagal, I., ... Bautista-Baños, S. (2012). Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  in fresh tomatoes. *Crop Protection*, 38, 1-6.
- Ren, J.P., Dickson, M.H., Earle, E.D. (2000). Improved resistance to bacterial soft rot by protoplast fusion between *Brassica rapa* and *B. oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(5), 810-819.
- Rentería-Martínez, M.E., Meza-Moller, A., Guerra-Camacho, M.A., Romo-Tamayo, F., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S.F. (2015). First report of watermelon wilting caused by *Fusarium brachygibbosum* in Sonora, Mexico. *Plant Disease*, 99(5), 729.
- Rentería-Martínez, M.E., Guerra-Camacho, M.A., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S.F., Meza-Moller, A.C., Guzmán-Ortíz, J.A. (2019). Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México. *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(1), 16-34.

- Renumarn, P., Srilaong, V., Uthairatanakij, A., Kanlayanarat, S., Jitareerat, P. (2014). The effects of immersion methods and concentration of ozonated water on the microbial counts and the quality and sensory attributes of fresh-cut broccoli. *International Food Research Journal*, 21(2), 533-539.
- Rezende, J.L., Fernandes, C.C., Costa, A.O.M., Santos, L.S., Vicente Neto, F., Sperandio, E.M., ... Miranda, M.L.D. (2020). Antifungal potential of essential oils from two varieties of *Citrus sinensis* (lima orange and bahia navel orange) in postharvest control of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Food Science and Technology*, 40(2), 405-409.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Vismer, H.F. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2101-2105.
- Riley, M.B., Williamson, M.R., Maloy, O. (2002). Plant disease diagnosis. *The Plant Health Instructor*. <https://bit.ly/2ThkHga>
- Rivas-Garcia, T., Hernandez-Montiel, L.G., Amador, B.M., Nieto-Garibay, A., Chiquito-Contreras, R.G., Rincon-Enriquez, G. (2018). Identification and characterization of *Fusarium* spp. from muskmelon in northwest Mexico. *Biotechnia*, 20(3), 71-75.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A. (2008). Effectiveness of a short hyperbaric treatment to control postharvest decay of sweet cherries and table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 49(3), 440-442.
- Romanazzi, G., Sanzani, S.M., Bi, Y., Tian, S., Gutiérrez-Martínez, P., Alkan, N. (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 82-94.
- Rothwell, J.G., Safianowicz, K., McConchie, R., Bell, T.L., Carter, D.A., Bradbury, M.I. (2021). Mixing postharvest fungicides and sanitizers results in unpredictable survival of microbes that effect cantaloupes. *Food Microbiology*, 99, 103797.
- Roy, S.S., Dasgupta, R., Bagchi, A. (2014). A review on phylogenetic analysis: A journey through modern era. *Computational Molecular Bioscience*, 4(3), 39-45.
- Ruangwong, O.-U., Wonglow, P., Phoka, N., Suwannarach, N., Lumyong, S., Ito, S.-I., Sunpapao, A. (2021). Biological control activity of *Trichoderma asperelloides* PSU-

- P1 against gummy stem blight in muskmelon (*Cucumis melo*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *115*, 101663.
- Ruiz-Cruz, S., Acedo-Félix, E., Díaz-Cinco, M., Islas-Osuna, M.A., González-Aguilar, G.A. (2007). Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. *Food Control*, *18*(11), 1383-1390.
- Russo, C.A.M., Selvatti, A.P. (2018). Bootstrap and rogue identification tests for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(9), 2327-2333.
- Rustanti, N., Murwani, R., Anwar, S. (2015). Combined inorganic iron (FeSO<sub>4</sub>) and steamed pumpkin (*Cucurbita moschata*) fortification in fresh noodles can increase hemoglobin levels in iron deficient mice. *Pakistan Journal of Nutrition*, *14*(6), 316-321.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406-425.
- Salehi, B., Capanoglu, E., Adrar, N., Catalkaya, G., Shaheen, S., Jaffer M., ... Capasso, R. (2019). *Cucurbits* plants: A key emphasis to its pharmacological potential. *Molecules*, *24*(10), 1854.
- Salem, E.A., Youssef, K., Sanzani, S.M. (2016). Evaluation of alternative means to control postharvest *Rhizopus* rot of peaches. *Scientia Horticulturae*, *198*, 86-90.
- Salman, M., Abuamsha, R. (2012). Potential for integrated biological and chemical control of damping-off disease caused by *Pythium ultimum* in tomato. *BioControl*, *57*, 711-718.
- Sandoval-Denis, M., Lombard, L., Crous, P.W. (2019). Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *43*(1), 90-185.
- Sapers, G.M. (2001). Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biotechnology*, *39*(4), 305-311.

- Schipper, M.A.A. (1984). A revision of the genus *Rhizopus*. I. The *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*. *Studies of Mycology*, 25, 1-19.
- Schipper, M.A.A., Stalpers, J.A. (1984). A revision of the genus *Rhizopus*. II. The *Rhizopus microsporus*-group. *Studies of Mycology*, 25, 20-34.
- Schroeder, K.L., Martin, F.N., de Cock, A.W.A.M., Lévesque, C.A., Spies, C.F.J., Okubara, P.A., Paulitz, T.C. (2013). Molecular detection and quantification of *Pythium* species: Evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant Disease*, 97(1), 4-20.
- Schütt, F., Nirenberg, H.I., Deml, G. (1998). Moniliformin production in the genus *Fusarium*. *Mycotoxin Research*, 14, 35-40.
- Secugen: Secuenciación ADN y Diagnóstico Genético (2021). Recuperado el 22 de mayo de 2021 de <https://www.secugen.es>
- Sedki, R., El-Mohamedy, R. (2012). Biological control of *Pythium* root of broccoli plants under greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Technology*, 8(3), 1017-1028.
- Seepe, H.A., Lodama, K.E., Sutherland, R., Nxumalo, W., Amoo, S.O. (2020). In vitro antifungal activity of South African medicinal plant extracts against *Fusarium* pathogens and their phytotoxicity evaluation. *Plants*, 9(12), 1668.
- Sellitto, V.M., Zara, S., Fracchetti, F., Capozzi, V., Nardi, T. (2021). Microbial biocontrol as an alternative to synthetic fungicides: Boundaries between pre- and postharvest applications on vegetables and fruits. *Fermentation*, 7(2), 60.
- Sevel, P., Kugathasan, D., Emmanuel, C.J. (2020). Fruit rot disease in butternut squash caused by *Pythium aphanidermatum* in Trincomalee district, Sri Lanka. *Ceylon Journal of Science*, 49(5), 373-380.
- Shafique, H.A., Sultana, V., Ehteshamul-Haque, S., Athar, M. (2016). Management of soil-borne diseases of organic vegetables. *Journal of Plant Protection Research*, 56(3), 221-230.

- Shen, D., Li, Q., Yu, J., Zhao, Y., Zhu, Y., Xu, H., Dou, D. (2017). Development of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Pythium ultimum*. *Australasian Plant Pathology*, 46, 571-576.
- Sheoran, N., Nadakkakath, A.V., Munjal, V., Kundu, A., Subaharan, K., Venugopal, ... Kumar, A. (2015). Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. *Microbiological Research*, 173, 66-78.
- Shi, Z., Wang, F., Zhou, W., Zhang, P., Fan, Y.J. (2007). Application of osthol induces a resistance response against powdery mildew in pumpkin leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 1001-1012.
- Shoaib, A., Ali, H., Javaid, A., Awan, Z.A. (2020). Contending charcoal rot disease of mungbean by employing biocontrol *Ochrobactrum ciceri* and zinc. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(7), 1385-1397.
- Singh, D., Sharma, R.R. (2018). Postharvest diseases of fruits and vegetables and their management. En M.W. Siddiqui (Ed), *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables* (pp. 1-52). Elsevier Academic Press.
- Sivakumar, D., Bautista-Baños, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27-37.
- Smith, D., Onions, A.H.S. (1994). *The preservation and maintenance of living fungi*. (2ª ed.). IMI Technical Handbooks N°2. Wallingford, UK: CAB International.
- Smith, D., Ryan, M. (2012). Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *The Scientific World Journal*, 805659.
- Snowdon, A.L. (1991). *A colour atlas of post-harvest diseases and disorders of fruits & vegetables*. Wolfe Scientific Ltd., Cambridge, United Kingdom.
- Song, H., Sun, Z. (2017). Hypolipidaemic and hypoglycaemic properties of pumpkin polysaccharides. *3 Biotech*, 7(3), 159.

- Sowndhararajan, K., Marimuthu, S., Manian, S. (2013). Biocontrol potential of phylloplane bacterium *Ochrobactrum anthropi* BMO-111 against blister blight disease of tea. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 209-218.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 846-849.
- Statista: Volumen de hortalizas producidas en España en 2019, por comunidad autónoma (2019). Recuperado el 07 de noviembre de 2021 de <https://es.statista.com/estadisticas/1223731/produccion-de-hortalizas-por-comunidad-autonoma-en-espana/>
- Stefanov, S., Hristov, H., Stoeva, D., Denkova, Z., Nikolova, R. (2012). Investigation of the process of storing packaged pumpkin in modified atmosphere. *Food and Environment Safety - Journal of Faculty of Food Engineering, Ștefan cel Mare University - Suceava*, XI(1), 54-59.
- St-Germain, G., Summerbell, R. (1996). *Identifying filamentous fungi: A clinical laboratory handbook*. Star Publishing Company, California, USA.
- Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M.C., López, M.J., Moreno, J. (2004). Survival of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* on plant waste. *Crop Protection*, 23(2), 127-133.
- Tahmasebi, M., Golmohammadi, A., Nematollahzadeh, A., Davari, M., Chamani, E. (2020). Control of nectarine fruits postharvest fungal rots caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* via some essential oils. *Journal of Food Science and Technology*, 57(5), 1647-1655.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004). *Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method*. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA).
- Tanina, K., Tojo, M., Date, H., Nasu, H., Kasuyama, S. (2004). Pythium rot of chingensai (*Brassica campestris* L. chinensis group) caused by *Pythium ultimum* var. *ultimum* and *Pythium aphanidermatum*. *Journal of General Plant Pathology*, 70(3), 188-191.



- Tano, K., Oulé, M.K., Doyon, G., Lencki, R.W., Arul, J. (2007). Comparative evaluation of the effect of storage temperature fluctuation on modified atmosphere packages of selected fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 46(3), 212-221.
- Telci, I., Sahbaz, N. (2005). Variation of yield, essential oil and carvone contents in clones selected from carvone-scented landraces of Turkish *Mentha* species. *Journal of Agronomy*, 4(2), 96-102.
- Teng, Z., Luo, Y., Alborzi, S., Zhou, B., Chen, L., Zhang, J., ... Wang, Q. (2018). Investigation on chlorine-based sanitization under stabilized conditions in the presence of organic load. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 150-157.
- Teyssier, C., Marchandin, H., Jean-Pierre, H., Masnou, A., Dusart, G., Jumas-Bilak, E. (2007). *Ochrobactrum pseudintermedium* sp. nov., a novel member of the family *Brucellaceae*, isolated from human clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1007-1013.
- Thompson, A.K. (2003). *Fruit and Vegetables. Harvesting, Handling and Storage*. (2<sup>a</sup> ed.). Blackwell Publishing.
- Tirado-Ramirez, M.A., López-Urquídez, G.A., Amarillas-Bueno, L.A., Retes-Manjarrez, J.E., Vega-Gutiérrez, T.A., Avendaño, J.E.L., López-Orona, C.A. (2021). Identification and virulence of *Fusarium falciforme* and *Fusarium brachygibbosum* as causal agents of basal rot on onion in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43(5), 722-733.
- Tripathi, P., Dubey, N.K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32(3), 235-245.
- Turtoi, M. (2013). Ultraviolet light treatment of fresh fruits and vegetables surface: A review. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 19(3), 325-337.
- Tzortzakis, N., Chrysargyris, A. (2017). Postharvest ozone application for the preservation of fruits and vegetables. *Food Reviews International*, 33(3), 270-315.

- Usall, J., Smilanick, J., Palou, L., Denis-Arrue, N., Teixidó, N., Torres, R., Viñas, I. (2008). Preventive and curative activity of combined treatments of sodium carbonates and *Pantoea agglomerans* CPA-2 to control postharvest green mold of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 1-7.
- Usall, J., Casals, C., Sisquella, M., Palou, L., De Cal, A. (2015). Alternative technologies to control postharvest diseases of stone fruits. *Stewart Postharvest Review*, 11(4), 1-6.
- Usall, J., Ippolito, A., Sisquella, M., Neri, F. (2016). Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 30-40.
- Uzuhashi, S., Tojo, M., Kakishima, M. (2010). Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience*, 51(5), 337-365.
- Uzuhashi, S., Nakagawa, S., Abdelzaher, H.M.A., Tojo, M. (2019). Phylogeny and morphology of new species of *Globisporangium*. *Fungal Systematics and Evolution*, 3(1), 13-18.
- Validov, S., Kamilova, F., Qi, S., Stephan, D., Wang, J.J., Makarova, N., Lugtenberg, B. (2007). Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stonewool substrate". *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 461-471.
- Van Der Plaats-Niterink, A.J. (1981). *Monograph of the genus Pythium*. *Studies in Mycology*, [Monografía 21], 1-242.
- Verás, M.L.M., de Araújo, F.F., Gomes Junior, J., Finger, F.L. (2019). Enzymatic activity and post-harvest quality of 'Galia' melon under storage temperatures and modified atmosphere. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 14(1), e5617.
- Vilaplana, R., Pérez-Revelo, K., Valencia-Chamorro, S. (2018). Essential oils as an alternative postharvest treatment to control fusariosis, caused by *Fusarium verticillioides*, in fresh pineapples (*Ananas comosus*). *Scientia Horticulturae*, 238, 255-263.

- Villarino, M., De la Lastra, E., Basallote-Ureba, M.J., Capote, N., Larena, I., Melgarejo, P., De Cal, A. (2019). Characterization of *Fusarium solani* populations associated with spanish strawberry crops. *Plant Disease*, 103(8), 1974-1982.
- Vinayashree, S., Vasu, P. (2021). Biochemical, nutritional and functional properties of protein isolate and fractions from pumpkin (*Cucurbita moschata* var. Kashi Harit) seeds. *Food Chemistry*, 340(2), 128177.
- Wang, J., Bi, Y., Wang, Y., Deng, J., Zhang, H., Zhang, Z. (2014). Multiple preharvest treatments with harpin reduce postharvest disease and maintain quality in muskmelon fruit (cv. Huanghemi). *Phytoparasitica*, 42(2), 155-163.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M.S. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T.J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods And Applications* (pp. 315-322). Academic Press, San Diego, California, USA.
- Wigmann, E.F., Behr, J., Vogel, R.F., Niessen, L. (2019). MALDI-TOF MS fingerprinting for identification and differentiation of species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(12), 5323-5337.
- Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Liu, J., Schena, L. (2016). Alternative management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 3-10.
- Wonglom, P., Sunpapao, A. (2020). *Fusarium incarnatum* is associated with postharvest fruit rot of muskmelon (*Cucumis melo*). *Journal of Phytopathology*, 168(1), 204-210.
- Xia, B., Hu, J.Y., Zhu, X.F., Liang, Y., Ren, X., Wu, Y.H., Chen, D.X. (2018). First report of sunflower broomrape wilt caused by *Fusarium brachygibbosum* in China. *Plant Disease*, 102(11), 2372.
- Yan, J., Wu, H., Shi, F., Wang, H., Chen, K., Feng, J., Jia, W. (2021). Antifungal activity screening for mint and thyme essential oils against *Rhizopus stolonifer* and their

- application in postharvest preservation of strawberry and peach fruits. *Journal of Applied Microbiology*, 130(6), 1993-2007.
- Yang, B., Yongcai, L., Yonghong, G., Yi, W. (2009). Induced resistance in melons by elicitors for the control of postharvest diseases. En D. Prusky y M. Gullino (Eds.), *Plant Pathology in the 21st Century* (Contributions to the 9th International Congress., Vol. 2, pp. 31-41). Springer, Dordrecht.
- Yilmaz, N., Sandoval-Denis, M., Lombard, L., Visagie, C.M., Wingfield, B.D., Crous, P.W. (2021). Redefining species limits in the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 46, 129-162.
- Yuan, L., Bi, Y., Ge, Y., Wang, Y., Liu, Y., Li, G. (2013). Postharvest hot water dipping reduces decay by inducing disease resistance and maintaining firmness in muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 161, 101-110.
- Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D.A., Nalim, F.A., Summerbell, R.C., Padhye, A.A., Geiser, D.M. (2006). Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2186-2190.
- Zhang, H., Mahunu, G.K., Castoria, R., Yang, Q., Apaliya, M.T. (2018). Recent developments in the enhancement of some postharvest biocontrol agents with unconventional chemicals compounds. *Trends in Food Technology*, 78, 180-187.
- Zhang, W., Jiang, W. (2019). UV treatment improved the quality of postharvest fruits and vegetables by inducing resistance. *Trends in Food Science & Technology*, 92(3), 71-80.
- Zhang, W., Jiang, H., Cao, J., Jiang, W. (2021a). Advances in biochemical mechanisms and control technologies to treat chilling injury in postharvest fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, 113(1), 355-365.
- Zhang, W., Cao, J., Jiang, W. (2021b). Application of electrolyzed water in postharvest fruits and vegetables storage: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 114(10), 599-607.

- Zhao, L., Teng, S., Liu, Y. (2012). Characterization of a versatile rhizospheric organism from cucumber identified as *Ochrobactrum haematophilum*. *Journal of Basic Microbiology*, 52(2), 232-244.
- Zheng, R.-Y., Chen, G.-Q., Huang, H., Liu, X.-Y. (2007). A monograph of *Rhizopus*. *Sydowia - An International Journal of Mycology*, 59(2), 273-372.
- Zitter, T.A., Hopkins, D. L., Thomas, C.E. (1998). *Compendium of cuburbit diseases*. The American Phytopathology Society, USA.
- Zouari, I., Masmoudi, F., Medhioub, K., Tounsi, S., Trigui, M. (2020). Biocontrol and plant growth-promoting potentiality of bacteria isolated from compost extract. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113, 2107-2122.
- Zurdo-Piñeiro, J.L., Rivas, R., Trujillo, M.E., Vizcaíno, N., Carrasco, J.A., Chamber, M., ... Velázquez, E. (2007) *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 784-788.