

Estado fitosanitario del azafrán en Aragón (España): insectos, ácaros, nematodos, virus, bacterias y malas hierbas

A. Cirujeda^{1,2,*}, M^a M. Coca-Abia^{1,2}, F. Escriu^{1,2}, A. Palacio-Bielsa^{1,2}, A.I. Marí¹, P. Zuriaga¹, J. Aibar³, M. Luis-Arteaga¹ y C. Zaragoza¹

¹ Unidad de Sanidad Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza

² Unidad de Sanidad Vegetal, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 – (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, Spain

³ Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Escuela Politécnica Superior de Huesca, Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 – (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain

Resumen

El azafrán cultivado en España está adquiriendo relevancia en las últimas décadas como producto de gran calidad, lo que requiere la selección de cormos (sus órganos reproductivos) sanos para la plantación con el objetivo de mantener un adecuado estado fitosanitario del cultivo. Este trabajo presenta un estudio del estado fitosanitario del azafrán en Teruel, donde el cultivo fue muy importante económica y socialmente. Además, este estudio pretende ser de utilidad para las zonas productoras con características agroclimáticas similares. Con dichos objetivos, se prospectaron 10 plantaciones comerciales de azafrán en 6 localidades del valle del Jiloca entre los años 2008 y 2011, estudiando la presencia de insectos, ácaros, nematodos, virus, bacterias y malas hierbas. El ácaro *Rhizoglyphus robini*, una de las plagas más importantes del azafrán, se detectó en los cormos y en el suelo en una parcela. También el nematodo *Aphelenchoides blastophthorus*, plaga en plantas ornamentales, se encontró abundantemente en cormos de dos parcelas. Se detectaron infecciones ocasionales de virus del género *Potyvirus* en el cultivo y en la mala hierba *Eruca vesicaria*. Las malas hierbas *Lolium rigidum* y *Descurainia sophia* podrían causar serios problemas de competencia al cultivo y se considera necesario realizar operaciones de escarda en otoño y en invierno. No se detectaron insectos nocivos ni bacterias fitopatógenas. La multiplicación vegetativa del azafrán hace aconsejable realizar muestreos, especialmente en los cormos antes de ser replantados, para detectar la presencia de ácaros, nematodos y virus que podrían ocasionar pérdidas de producción y calidad.

Palabras clave: *Rhizoglyphus robini*, *Aphelenchoides blastophthorus*, potyvirus, *Lolium rigidum*, *Descurainia sophia*, prevención.

Abstract

Phytosanitary status of saffron crop in Aragón (Spain): insects, mites, nematodes, viruses, bacteria and weeds

In the last decades, saffron produced in Spain is gaining relevance as a high-quality product, which requires the selection of healthy corms (the reproductive organ) for planting in order to maintain adequate phytosanitary status of the crop. In this work, the phytosanitary status of saffron was studied in Teruel (Aragón, Spain), where the crop has economic and social importance. Moreover, it aims to be useful for the production areas with similar agro-climatic characteristics. Ten commercial saffron plantations

* Autor para correspondencia: acirujeda@aragon.es

<http://dx.doi.org/10.12706/itea.2016.001>

in six locations of the Jiloca valley have been surveyed between 2008 and 2011 and the presence of insects, mites, nematodes, virus, bacteria and weeds was studied. The mite *Rhizoglyphus robini*, one of the most important pests of saffron, was detected in both corms and soil in one plantation. The nematode *Aphelenchoides blastophthorus*, pest in ornamental plants, was also found in corms in two plantations. Potyvirus infections were occasionally detected in both the crop and in the weed *Eruca vesicaria*. The weeds *Lolium rigidum* and *Descurainia sophia* could cause diminutions of the yield by competition, therefore, weeding operations are necessary in autumn and winter. No harmful insects and phytopathogenic bacteria were detected. Because reproduction is only possible through corm propagation, it is advisable to analyse the plants, especially the corms, before being re-planted, in order to detect the presence of mites, nematodes and virus that could reduce yield and quality decreases.

Key words: *Rhizoglyphus robini*, *Aphelenchoides blastophthorus*, potyvirus, *Lolium rigidum*, *Descurainia sophia*, prevention.

Introducción

El azafrán (*Crocus sativus* L.) pertenece a la familia Iridaceae, cuyo género comprende 85 especies distribuidas en áreas con inviernos fríos y veranos cálidos. El azafrán es una especie geófito de floración otoñal. Se caracteriza por un reposo estival, durante el cual la planta sobrevive a los períodos de sequía y altas temperaturas a través de sus cormos, que son sus estructuras reproductivas que permanecen bajo tierra y generan uno o varios cormos nuevos anualmente. El ciclo biológico comienza después de las primeras lluvias de otoño con el crecimiento vegetativo de la parte aérea, la emisión de hojas y flores, terminando con la producción de cormos de sustitución a finales de marzo. Contrariamente a otras especies del género *Crocus* que florecen en invierno-primavera, el azafrán florece en otoño, desde mediados de octubre hasta finales de noviembre, dependiendo de las condiciones climáticas.

El azafrán es una especie interesante debido a su agradable color, sabor y fragancia, y ha sido utilizada con fines medicinales, cosméticos y como tinte desde la edad de bronce tardía, cuando esta planta geófito fue domesticada (Ferrence y Bendersky, 2004). En la actualidad, el azafrán se produce en algunos países mediterráneos europeos como España,

Italia y Grecia. En España fue cultivado tradicionalmente de forma masiva hasta los años sesenta, tanto en Castilla-La Mancha como en el valle del Jiloca (Teruel) y proporcionaba elevados ingresos (Pérez Bueno, 1989). Debido al despoblamiento de la zona rural, la superficie cultivada descendió desde 11.282 ha en 1930 (Pérez Bueno, 1989) a 200 ha en 2004 (Fernández, 2004). No obstante, la superficie se ha mantenido en 146 ha en 2012 en Castilla-La Mancha (MAGRAMA, 2013) y en Teruel, la creación de la Asociación de Productores de Azafrán del valle del Jiloca (AZAJI) en 2004 y de dos empresas especializadas son muestra del interés de potenciar este cultivo que dispuso de aproximadamente 15 hectáreas en la zona en el año 2014 (AZAJI, com. pers.), buscando ofrecer excelente calidad al consumidor. Se han llevado a cabo prospecciones de cormos para completar colecciones de germoplasma en cinco países productores y comercializadores de azafrán de la Unión Europea (UE) y en siete países no pertenecientes a ella (Fernández et al., 2011), lo cual demuestra el interés por este cultivo no sólo en España sino también en otros países como Grecia, Hungría, Francia, Italia, Azerbaiyán, Turquía, Egipto, etc. Si bien se ha avanzado notablemente en estudios genéticos, la información disponible desde el punto de vista de la sanidad vegetal sigue siendo escasa.

El cultivo del azafrán es perenne y en España la permanencia en el suelo tiene una duración de 3 a 4 años (Fernández, 2004). Con el paso del tiempo, la producción de la especie se reduce por el incremento de la competencia entre plantas por el agua y los nutrientes, así como por el menor tamaño de los cormos y su menor capacidad de florecer. Además, el azafrán es androestéril y se multiplica exclusivamente de forma vegetativa (Grilli Caiola y Canini, 2010), por lo que la selección apropiada de cormos y la revisión de su estado fitosanitario antes de replantarlos es esencial para la conservación de las mejores características morfológicas, productivas y de calidad. Los agricultores rechazan aquellos cormos podridos o dañados, lo que no permite descartar la posible existencia de patógenos no fácilmente visibles. En cuanto a las malas hierbas, no existen datos sobre las especies más frecuentes, más abundantes y más competitivas en este cultivo, exceptuando algunos estudios realizados en Irán (Kumar et al., 2009; Mesgaran et al., 2008). Sin embargo, este conocimiento es imprescindible para poder planificar bien las tareas de desherbado y contribuir a una elevada producción y calidad. Actualmente, se realiza un desherbado manual tradicional en combinación con el uso de pequeños aperos, pero es esencial el conocimiento de las malas hierbas más dañinas para poder realizar estas tareas de forma eficaz y en el momento adecuado.

Muchos insectos fitófagos pueden alimentarse de cultivos, llegando a ser plagas importantes. El estudio de la relación entre el insecto fitófago y el cultivo es importante para establecer estrategias de control adecuadas a las características biológicas, fisiológicas y agronómicas del cultivo. Como ya se ha mencionado, a diferencia de la mayoría de las plantas cultivadas y silvestres, el azafrán tiene la peculiaridad de presentar un ciclo otoño-invierno-primavera, floreciendo en otoño (octubre-noviembre). Esta característica puede

llegar a ser ventajosa, ya que el período de floración no coincide con el máximo poblacional de insectos en el ambiente. No obstante, se han descrito en el azafrán algunas plagas de insectos (trips) y ácaros (*Rhizoglyphus robini*) que pueden afectar a las hojas y cormos en épocas de no floración (Shahrokhi et al., 2006). Además, el hecho de que sea una especie geófita la hace vulnerable a especies nocivas de invertebrados edáficos, como algunos ácaros y nematodos. Por otra parte, algunos invertebrados no edáficos, como pulgones, trips u otros nematodos, podrían actuar como vectores de enfermedades.

Además del posible papel de los vectores, la reproducción vegetativa obligada del azafrán constituye la vía más directa de dispersión de enfermedades, como las ocasionadas por virus y bacterias. En azafrán se han descrito infecciones naturales causadas por el virus del mosaico del nabo (TuMV del nombre en inglés: *Turnip mosaic virus*), el virus del mosaico amarillo de la judía (BYMV: *Bean yellow mosaic virus*) y otros miembros del género *Potyvirus* (familia *Potyviridae*). Frecuentemente, las infecciones por potyvirus son latentes en azafrán, sin la aparición de síntomas visibles (Grilli Caiola y Faoro, 2011). Otras especies de *Crocus* silvestres y ornamentales se han descrito también como huéspedes de potyvirus y de virus de otras familias, como el virus del mosaico del pepino (CMV: *Cucumber mosaic virus*), el virus del bronceado del tomate (TSWV: *Tomato spotted wilt virus*), el virus del cascabeleo del tabaco (TRV: *Tobacco rattle virus*) y el virus del mosaico del arabis (ArMV: *Arabis mosaic virus*). Todos ellos pueden transmitirse por propagación vegetativa, pero los potyvirus y CMV se transmiten además por pulgones, TSWV por trips, y TRV y ArMV por nematodos de las familias Trichodoridae y Longidoridae. Los citados aquí están presentes en España (Abelleira et al., 2010; Melgarejo et al., 2010) y, por tanto, podrían constituir un riesgo potencial para nuestros cultivos de azafrán.

La información acerca de las enfermedades bacterianas en el cultivo del azafrán es muy escasa, y la única bacteria fitopatógena descrita es *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (anteriormente *Pseudomonas gladioli*) (Xu y Ge, 1990). Esta bacteria también afecta a otras especies del género *Crocus*, *Gladiolus* spp., *Freesia* spp., *Iris* spp. y a otros miembros de la familia Iridaceae. *B. gladioli* pv. *gladioli* produce lesiones en las hojas y pudrición de los cormos. Las lesiones en hojas están a menudo localizadas en la porción basal de las mismas. En las fases iniciales de la infección se observan pequeñas manchas de color rojizo en las hojas, que posteriormente aumentan de tamaño y adquieren una coloración marrón oscura o negra, mostrando un ligero hundimiento en la zona central de la lesión. Las partes aéreas de la planta se desprenden del cormo con facilidad. En los cormos, las lesiones iniciales se muestran como áreas hundidas de color amarillo o anaranjado y, en fases avanzadas de la infección, tiene lugar la pudrición de los cormos que, al ser presionados, liberan exudados de color amarillento. *B. gladioli* pv. *gladioli* ha sido descrita en algunos países de Asia, América, África, Australia y Europa (CABI, 2012). Los brotes severos de la enfermedad pueden llegar a ocasionar importantes pérdidas (Fiori et al., 2011). Recientemente se ha sugerido que otra posible especie del género *Burkholderia*, todavía no identificada, podría estar también asociada con las podredumbres blandas del azafrán en Italia (Fiori et al., 2011).

El azafrán es un cultivo con un lento desarrollo y de porte escaso, lo que hace de él un competidor pobre (Soufizadeh et al., 2007). La competencia con las malas hierbas provoca una reducción en la producción, e incluso la muerte del cultivo si ésta es muy elevada (Kumar et al., 2009). Algunos autores consideran las malas hierbas como el principal problema de este cultivo (Ghorbani y Kocheki, 2007; Gresta et al., 2008). Las malas hierbas más dañinas podrían ser las especies

con presencia en otoño que dificultan la cosecha de las flores y, por otro lado, aquellas especies que se desarrollan en la primavera hasta la desaparición de la parte aérea del cultivo en mayo, que conllevan una menor producción de cormos y flores en el otoño siguiente (Gresta et al., 2008). A pesar de su importancia, no existe información sobre las malas hierbas más frecuentes y abundantes en el cultivo de azafrán y, por tanto, no se ha determinado cuáles son las especies más problemáticas. No obstante, este conocimiento resulta imprescindible para poder planificar estrategias efectivas de control. También es necesario tener en cuenta que las malas hierbas pueden ser reservorios de virus que, a su vez, podrían ser transmitidos a las plantas de azafrán mediante insectos vectores (Cooper y Jones, 2006). Por ello, es importante acometer un estudio multidisciplinar para poder aportar información al respecto.

El objetivo de este trabajo es describir el estado fitosanitario del cultivo de azafrán en el valle del Jiloca (Teruel), prestando especial atención a insectos, ácaros y nematodos como potenciales plagas y/o transmisores de enfermedades, virus, bacterias y malas hierbas, así como a las posibles interacciones entre ellos.

Material y métodos

El estudio se ha llevado a cabo entre los años 2008 y 2011. Se han realizado prospecciones en 10 plantaciones comerciales de azafrán situadas en seis localidades del valle del Jiloca (Fuentes Claras, Blancas, Monreal del Campo, Peracense, Torrijo del Campo y Caminreal), situadas en la provincia de Teruel (España). En ellas se evaluó la presencia de insectos, ácaros, nematodos, virus y bacterias en la parte aérea del cultivo o en los cormos y en el suelo, así como las malas hierbas en las plantaciones (Tabla 1). Para llevar a cabo el estudio del estado fitosanitario de los cormos, éstos se extrajeron del suelo entre los años 2008 y 2010.

Tabla 1. Plantaciones comerciales de azafrán estudiadas en el valle del Jiloca (Teruel)
 Table 1. Commercial saffron fields surveyed at the Jiloca valley (Teruel)

Localidad	Coordenadas UTM (x/y/z)	Tamaño de parcela (m ²)	Fechas de muestreos	Organismo estudiado
Fuentes Claras				
Parcela I	642846 / 4524306 / 930	600	Primavera 2008	A, I, N, V
			Verano 2008	A, N
			Otoño 2008	V
Parcela II	641762 / 4525675 / 913	1.000	Primavera 2010	B, V, MH
			Primavera 2008	I, V
			Verano 2008	B
			Otoño 2008	V
Blancas				
Parcela I	627198 / 4520315 / 1075	2.500	Primavera 2008	I, V
			Verano 2008	B
			Otoño 2008	V
Parcela II	626916 / 4520407 / 1089	5.500	Primavera 2008	A, I, N, V
			Verano 2008	A, B, N
			Otoño 2008	V
			Primavera 2010	B, MH
Verano 2010			Verano 2010	V
Monreal del Campo				
Parcela I	638466 / 4515353 / 949	5.000	Primavera 2010	MH
Parcela II	639023 / 14514877 / 938	200	Primavera 2010	A, B, N, V, MH
Parcela III	639581 / 4512622 / 952	1.800	Primavera 2010	MH
Peracense	630317 / 4499776 / 1231	1.000	Primavera 2010	A, B, N, V, MH
			Verano 2010	A, N
Torrijo del Campo	640308 / 4521075 / 923	1.400	Primavera 2010	MH
Caminreal	641239 / 4521693 / 920	3.500	Primavera 2010	MH

A: ácaros; B: bacterias; I: insectos; MH: malas hierbas; N: nematodos; V: virus.
 Coordenadas UTM en European Datum 50.

Caracterización de insectos, ácaros y nematodos

Los muestreos se realizaron tanto en la parte epigea (hojas) como hipogea (cormos y suelo) del cultivo. Las muestras de la parte epigea se obtuvieron en cuatro parcelas durante dos períodos para maximizar la cobertura espacio-temporal en el área de estudio: primavera (marzo-abril) y otoño (octubre-noviembre) de 2008 (Tabla 1). La técnica empleada para la recogida de insectos fue el barrido con una manga entomológica de 25 cm de diámetro. Las muestras de hojas se recogieron manualmente, seleccionando aleatoriamente dos plantas por parcela. Para los muestreos de la parte hipogea del cultivo se recogieron 54 cormos. Aquellos que presentaron ácaros, u otra fauna de artrópodos en las cubiertas exteriores, se cortaron en láminas y se estudiaron bajo lupa binocular para detectar posibles áreas necrosadas. Se recogió una muestra de 100 ml de suelo. En las parcelas en las que no se observaron síntomas, las muestras se tomaron al azar, sin embargo en las parcelas con rodales o indicios de enfermedad, las muestras se tomaron en estas áreas sospechosas de la presencia de organismos nocivos. Se utilizó el embudo Berlese para aislar los artrópodos edáficos de las muestras de suelo. Muestras de suelo, cormo y hojas se enviaron al Laboratorio de Referencia de nematodos del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid (CSIC) para la identificación de especies.

Caracterización de virus

Durante las prospecciones, realizadas en primavera y otoño (Tabla 1), se recolectó al azar un mínimo de 10 muestras foliares por parcela, siguiendo en cada una de ellas un itinerario predefinido. Igualmente, se recogieron hojas y flores de azafrán o de la flora arvense que mostraban síntomas atribuibles a una etiología viral (mosaicos, clorosis, de-

formaciones, estriados o rotura de color en flores, etc.). También se recolectaron cormos proporcionados por los agricultores, que habían sido previamente rechazados como material de propagación debido a la presencia de manchas necróticas, deformación o tamaño insuficiente.

Se analizó un total de 215 muestras por serología mediante ELISA (Clark y Adams, 1977) usando antisueros comerciales preparados para la detección general de potyvirus (Agdia, Elkhart, Indiana, EE. UU.) o para la detección específica de CMV, TuMV y BYMV (DSMZ, Braunschweig, Alemania).

Se prepararon extractos de las muestras positivas (diluidos en proporción 1:4 en 30mM Na_2HPO_4 , 0,2% dietil-ditiocarbamato sódico, carborundo y carbón vegetal, ambos a 75 mg ml^{-1}) y se inocularon en una gama de 17 especies indicadoras pertenecientes a siete familias botánicas distintas: Amarantaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae y Solanaceae (el listado de especies se presenta en la Tabla 4). Las plantas se mantuvieron en invernadero bajo condiciones controladas al menos 30 días tras la inoculación, período durante el que se anotaron las reacciones observadas en cada huésped.

Caracterización de bacterias

En primavera y verano del período 2008-2010, se recolectaron muestras en parcelas ubicadas en seis localidades (Tabla 1). Se recogieron 882 cormos que presentaban daños, aunque solo se analizaron 54 de ellos, puesto que presentaban síntomas similares a los descritos para la infección por *B. gladioli* pv. *gladioli*. Los cormos se desinfectaron superficialmente mediante inmersión en hipoclorito sódico (0,5%) y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Se seleccionaron pequeños fragmentos del tejido próximo a las

lesiones (zona de avance) y se dilaceraron en 10 ml de agua destilada estéril. Las suspensiones resultantes se sembraron en medio de cultivo B de King (King et al., 1954) y se incubaron a 25°C durante 72 h. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaban el aspecto característico del género *Burkholderia* en este medio: color blanco cremoso y no fluorescentes bajo iluminación UV. Los aislados se purificaron y caracterizaron mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas (Hildebrand et al., 1973), amplificación por PCR con iniciadores específicos para *B. gladioli* (Furuya et al., 2002) y reacción de hipersensibilidad en tomate y tabaco (Klement y Goodman, 1967). La cepa tipo de *B. gladioli* pv. *gladioli* ATTC 10248 se utilizó como testigo en todas las pruebas. El poder patógeno de una selección representativa de estos aislados se confirmó mediante inoculación en cormos sanos desinfectados del modo descrito anteriormente. Se realizaron heridas en los cormos y se depositaron en ellas las suspensiones bacterianas (10^7 UFC ml⁻¹). Cada uno de los aislados bacterianos se inoculó en cinco cormos. Se incluyeron cinco cormos sanos inoculados con agua destilada estéril como control negativo y la cepa tipo de *B. gladioli* pv. *gladioli* ATTC 10248 se utilizó como control positivo. Los cormos inoculados se incubaron en una cámara de cultivo a 25°C y en condiciones de humedad relativa próxima al 100% durante 6 días, observándolos regularmente para detectar posibles síntomas.

Prospecciones de malas hierbas

Después de haber iniciado ensayos de control mecánico en las parcelas de Fuentes Claras I y II y Monreal del Campo III entre los años 2007 y 2011 (Cirujeda et al., 2014), se decidió realizar una prospección en ocho parcelas comerciales de azafrán en primavera de 2010 (Tabla 1), cuando el azafrán estaba en su máximo desarrollo vegetativo aéreo. En todas las par-

celas se había llevado a cabo algún tipo de escarda en las semanas o meses anteriores. Con la elección de esta época de muestreo se trató de identificar la flora infestante después de la cosecha del azafrán, momento en el cual se pueden detectar aquellas especies que no fueron controladas en el período anterior, o que germinaron con posterioridad a la escarda realizada. En los únicos trabajos encontrados en la bibliografía sobre esta temática, realizados en Irán (Shahrokhi et al., 2006), las prospecciones se llevaron a cabo en la misma época, lo que permite la comparación de ambos estudios. Debido al reducido tamaño de las parcelas se prospectaron los campos enteros. Para ello, dos personas entrenadas los recorrieron siguiendo transectos en zigzag, anotando las especies de malas hierbas encontradas, su abundancia media en la parcela y el porcentaje total de cobertura del suelo por el conjunto de especies. Se utilizó la flora de Carretero (2004) para la identificación de especies.

Resultados

Insectos

En la plantación I de Fuentes Claras la abundancia de insectos fue mayor que en el resto de los campos, dominando la especie *Ceutorhynchus pulvinatus* (Coleoptera: Curculionidae: Ceutorhynchini), seguida de los Hymenoptera y Diptera (Tabla 2). En la plantación II de Blancas la abundancia fue intermedia, también con preponderancia de los Coleoptera, mientras que en la plantación II de Fuentes Claras (II) y la plantación I de Blancas la abundancia fue la más baja, y además, en esta última parcela, la riqueza taxonómica fue la menor (Tabla 2). En todas las plantaciones muestreadas los Hemiptera y Thysanoptera fueron poco abundantes. No se recogió ningún insecto cuando se muestreó la parte aérea del cultivo en la época de floración.

Tabla 2. Riqueza (nº de taxones) y abundancia (nº de individuos/taxón) de insectos encontrados en la estación vegetativa (primavera de 2008)
 Table 2. Insect richness (taxon number) and abundance (individuals/taxon) found in the saffron fields during the vegetative phase (spring 2008)

Localidad	Fuentes Claras		Blancas	
	I	II	I	II
Parcela				
<i>Ceutorhynchus pulvinatus</i>	293	7	0	57
Otros Coleoptera	84	16	4	43
Hymenoptera	110	14	4	29
Diptera	106	19	0	35
Hemiptera	10	3	1	6
Thysanoptera	12	2	1	5

Ácaros

En la plantación II de Monreal del Campo se encontró una gran abundancia de individuos de *Rhizoglyphus robini* (Acaridae) tanto en el suelo como en la corteza de los cormos y en zonas necróticas de éstos en el muestreo realizado en primavera. Este ácaro no se detectó en ninguna muestra de cormos y suelo procedentes del resto de las parcelas.

Nematodos

En total se identificaron 22.441 ejemplares de nematodos procedentes de muestras de suelo y cormos, representando a 11 géneros y ocho familias (Tabla 3 y 4). Las muestras de suelo mostraron mayor riqueza específica de nematodos que los cormos. Sin embargo, la mayor abundancia se obtuvo en las muestras de cormos, en las que la especie predominante fue *Aphelenchoides blastophthorus*, representando el 64,5% de la abundancia total. En la plantación II de Blancas y en la plantación II de Monreal del Campo la abundancia de esta especie fue mucho mayor que en el resto de las parcelas. En todas las muestras de suelo se detectaron *Acrobelles*, *Acro-*

beloides y *Aphelenchus avenae* aunque con baja abundancia. En las hojas solo se detectaron unos pocos especímenes de *A. blastophthorus* y Rhabditidos, en muestras procedentes de la plantación I de Fuentes Claras y plantación II de Monreal del Campo. En el resto de las parcelas no se encontró ningún nematodo parásito en hojas.

Virus

Durante las prospecciones realizadas en los períodos de cultivo 2007-2008 y 2008-2009 (primavera y otoño de 2008, respectivamente) no se observaron síntomas en plantas de azafrán que fueran atribuibles a un origen viral. Solo se observaron de forma ocasional plantas con hojas retorcidas en espiral o con los ápices foliares de color amarillo en algunas de las parcelas. Estas alteraciones, sin importancia sintomatológica aparente, podían deberse a la emergencia de las plantas en un suelo extremadamente seco y duro. Dichas plantas fueron analizadas en laboratorio para descartar una posible etiología viral. En el período 2009-2010 (primavera de 2010) sólo se encontró en la parcela de II de Blancas una planta de la especie *Eruca vesicaria*

Tabla 3. Nematodos encontrados en muestras de 100 ml de suelo en cada parcela (2008/2010)
 Table 3. Nematodes found in 100 ml soil samples in each plot (2008/2010)

Familia	Género/Especie	Fuentes Claras	Blancas	Monreal del Campo	Peracense
		I	II	II	
Aphelenchidae	<i>Aphelenchus avenae</i>	74	26	22	5
Aphelenchoididae	<i>Aphelenchoides</i>	2	–	–	–
Cephalobidae	<i>Acrobeles</i>	3	24	16	8
Cephalobidae	<i>Acrobelloides</i>	18	60	6	80
Cephalobidae	<i>Cephalobus</i>	–	7	10	14
Dorylaimidae	No identificado	–	40	60	38
Hoplolaimidae	<i>Helicotylenchus</i>	–	–	–	2
Hoplolaimidae	<i>Rotylenchus</i>	–	–	–	1
Qudsianematidae	<i>Ecumenicus</i>	6	–	–	–
Rhabditidae	No identificado	–	–	30	–
Rhabditidae	<i>Rhabditis</i>	9	–	5	14
Tylenchidae	<i>Psylenchus</i>	–	2	8	–
Tylenchidae	<i>Tylenchus</i>	–	10	–	2

Tabla 4. Nematodos encontrados en 5 cormos en cada parcela (2008/2010)
 Table 4. Nematodes found in 5 corms in each plot (2008/2010)

Familia	Género/Especie	Fuentes Claras	Blancas	Monreal del Campo	Peracense
		I	II	II	
Aphelenchoididae	<i>Aphelenchoides blastophorus</i>	212	6552	7623	68
Aphelenchidae	<i>Aphelenchus avenae</i>		17		
Cephalobidae	<i>Acrobelloides</i>				15
Rhabditidae	No identificado	18	77	7245	12

con mosaico y distorsiones foliares que indicaban una posible infección viral.

Se analizó por ELISA un total de 150 muestras foliares, 12 procedentes de flores y 49 procedentes de cormos de azafrán para detectar infecciones por CMV, los potyvirus TuMV y

BYMV o cualquier otro potyvirus. De ellas, solo una muestra foliar y otra de cormo, ambas recogidas en la misma parcela de Monreal del Campo en primavera de 2010, resultaron positivas frente al suero general de potyvirus y al específico de TuMV. Además,

tres muestras foliares adicionales procedentes de germoplasma de *Crocus* sp. recolectado en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) para su caracterización fueron positivas al suero general de potyvirus, detectándose en dos de ellas la presencia de BYMV.

Para confirmar la infección viral de las plantas que resultaron positivas por serología y descartar su infección por otros virus de transmisión mecánica, se inocularon extractos de dichas plantas en una gama de huéspedes indicadores. La reacción observada en ellos al inocular las dos muestras procedentes de Monreal del Campo y la muestra de *E. vesicaria* fue la esperada para TuMV (Tabla 5). Concretamente, se observó la inducción de mosaico sistémico en nabo (*Brassica rapa*), de lesiones locales cloro-necróticas sin aparición de síntomas de infección sistémica en tabaco (cvs. 'Xanthi nc', 'Samsun' y 'Paraguay') y de síntomas de infección local y sistémica en otras especies del género *Nicotiana*. No se observaron síntomas en rábano (*Raphanus sativus*). La infección por TuMV de varios huéspedes indicadores (*Chenopodium quinoa*, *Nicotiana clevelandii*, *N. megalosiphon* y *N. benthamiana*) inoculados con extractos de la planta de *E. vesicaria* se confirmó además por serología. La reacción observada al inocular muestras positivas para BYMV solo consistió en la aparición de manchas locales cloróticas en *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, judía (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia faba*) y guisante (*Pisum sativum*), sin que se observaran síntomas de infección sistémica.

Por último, en otoño de 2012, una planta de azafrán procedente de cormos proporcionados por agricultores y mantenida en el herbario del CITA mostró rotura de color en flores y distorsión del eje de los pétalos. La inoculación de un extracto de estos pétalos en huéspedes indicadores reprodujo los mismos síntomas descritos anteriormente, característicos de la infección por TuMV.

Bacterias

No se observaron síntomas de infección bacteriana en las hojas. Solo 54 de un total de 882 cormos mostraban síntomas de pudrición (8%), aunque éstos no correspondían con el aspecto característico de la lesiones producidas por *B. gladioli* pv. *gladioli*. Se obtuvieron aislados bacterianos con las siguientes características: no fluorescentes en medio B de King, gram negativos, anaerobios estrictos, positivos para actividad oxidasa, reducción de nitratos e hidrólisis de gelatina y arginina; y negativos para la producción de indol. Estas características bioquímicas coinciden con las esperadas para *Pseudomonas* spp., pero no con las propias de *B. gladioli* pv. *gladioli*. No se obtuvo amplificación mediante PCR para ninguno de los aislados, mientras que se amplificó un fragmento del tamaño esperado (300 pb) para la cepa ATCC 10248 de *B. gladioli* pv. *gladioli* utilizada como testigo. Los aislados ensayados no indujeron reacción de hipersensibilidad en hojas de tomate o tabaco. No se observaron síntomas en los cormos inoculados con los aislados analizados ni con el control negativo de agua, mientras que en los controles positivos se observaron las pudriciones características. Por tanto, las bacterias estudiadas no eran fitopatógenas y correspondían a flora saprofita.

Infestación por malas hierbas

El porcentaje medio de cobertura del suelo por malas hierbas en las parcelas prospectadas en primavera fue de $27 \pm 6,2\%$, lo cual es considerable teniendo en cuenta que en todos los campos se había llevado a cabo un desherbado manual o mecánico entre unos meses y unas semanas antes de la evaluación. Además, cabe tener en cuenta que el cultivo mostraba su máxima cobertura del suelo en el momento de realizar la prospección y las hojas mostraban su máxima capacidad competitiva.

Tabla 5. Reacción de una gama de huéspedes indicadores a la inoculación de muestras infectadas por TuMV (hojas, cormos y flores de azafrán, y hojas de *E. vesicaria*)
 Table 5. Host range responses in inoculations from samples infected by TuMV (saffron leaves, corms, flowers and leaves of *E. vesicaria*)

Familia botánica	Huéspedes indicadores	Reacción ¹ local / sistémica
Amarantaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	LL n / 0
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i>	0 / 0
Brassicaceae	<i>Brassica rapa</i>	0 / M
	<i>Raphanus sativus</i>	0 / 0
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LLcn / Scn
	<i>C. quinoa</i>	LLcn / M
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i>	0 / 0
	<i>Cucumis sativus</i>	0 / 0
Fabaceae	<i>Vigna unguiculata</i>	0 / 0
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i> cv. 'Doux des Landes'	0 / 0
	<i>Datura stramonium</i>	0 / 0
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	LLc / M
	<i>N. clevelandii</i>	LLn / M
	<i>N. megalosiphon</i>	LLc / Rcn
	<i>N. tabacum</i> cv. 'Paraguay'	LLcn / 0
	<i>N. tabacum</i> cv. 'Samsun'	LLcn / 0
	<i>N. tabacum</i> cv. 'Xanthi nc'	LLcn / 0
	<i>Physalis floridana</i>	0 / 0
<i>Solanum melongena</i> cv. 'Cerna Krazavitz'	0 / 0	
<i>S. melongena</i> cv. 'Violette de Barbentane'	0 / 0	

¹ c: clorótico(a); n: necrótico(a); cn: cloro-necrótico(a); LL: lesión local; M: mosaico; S: manchas; R: manchas anulares; 0: ausencia de síntomas.

Se identificaron un total de 43 especies, siendo la riqueza media de $13 \pm 3,1$ especies. *Lamium amplexicaule* fue la más frecuente (86% de las parcelas), seguida por *Diplotaxis eruroides* y *Descurainia sophia* (71%), *Veronica hederifolia*, *Papaver rhoeas*, *Medicago* spp. y *Eruca vesicaria* (57%) y *Anacyclus clavatus*, *Hordeum murinum*, *Crepis vesicaria*, *Malva sylvestris* y *Cirsium arvense* (43%). El resto de las especies de ma-

las hierbas presentes se encontraron en frecuencias menores. La densidad media fue baja ($2 \pm 0,6\%$ cobertura del suelo) exceptuando algunas especies que posiblemente causaron serios problemas de competencia: *Lolium rigidum* (densidad media, cuando presente, del 20%) y, en un segundo rango de abundancias, *D. eruroides*, *Stellaria media* e *Hypocoum procumbens* (6%) y *L. amplexicaule* (4%).

Discusión

Los resultados descritos confirman la existencia de organismos nocivos para el cultivo. El gorgojo *C. pulvinatus* fue el insecto más abundante y parece estar relacionado con las flores de especies pertenecientes a la familia de las Brassicaceae (DBIF, 2013). Al igual que los Hymenoptera y Diptera encontrados, *C. pulvinatus* no está citado como plaga en el azafrán. Asimismo, entre los insectos se han citado los trips como causantes de daños en plantaciones de azafrán. Concretamente *Thrips tabaci* puede desarrollarse en las hojas, alcanzando su máximo demográfico en los meses de marzo y abril (Shahrokhi et al., 2006). La ausencia de insectos en floración puede estar causada por las bajas temperaturas. Las especies de malas hierbas más frecuentes pertenecientes a esta familia fueron *D. eruroides* y *E. vesicaria*, muy abundantes en las áreas muestreadas, sobre todo en la plantación I de Fuentes Claras.

Por otro lado, los ácaros y nematodos podrían jugar un papel decisivo en la dispersión e incremento de daños causados por bacterias fitopatógenas en el cormo de la planta (Young, 1954; Forsberg, 1955, 1959). En efecto, el ácaro *R. robini*, considerado una de las plagas más importantes en el cultivo del azafrán (Shahrokhi et al., 2006) puede también albergar bacterias y hongos en el tracto digestivo llegando a ser un importante vector de enfermedades (Díaz et al., 2000). De hecho, se ha descrito la adquisición y retención de la bacteria fitopatógena *B. gladioli* pv. *gladioli* por *R. robini* (Poe et al., 1979). No obstante, el paso de bacterias y propágulos fúngicos viables a través del intestino del ácaro no es una evidencia suficiente para considerarlo como vector de enfermedades, especialmente porque también podrían estar involucrados otros mecanismos más complejos en la transmisión de bacterias y hongos. Beute y Benson (1979) sugieren que la microfaua del suelo puede producir daños ra-

diculares contribuyendo a: i) crear vías de entradas de patógenos; ii) acumular inóculos en lugares de infección y iii) alterar la sensibilidad del huésped a la enfermedad. Esto coincide con nuestras observaciones en la plantación II de Monreal del Campo, donde *R. robini* fue especialmente abundante en el suelo y en la corteza de los cormos, lo que sugeriría que la infestación del ácaro podría proceder del suelo por penetración a través de la parte basal o de las cubiertas más internas de la corteza del cormo (Okabe y Amano, 1991). La amplitud de los mecanismos involucrados en la transmisión de enfermedades por este ácaro permanece sin determinar, ya que en nuestro estudio no se ha encontrado ninguna bacteria fitopatógena que pudiera ser transmitida por *R. robini*. No obstante, en caso de introducción en la zona de *B. gladioli* pv. *gladioli*, la presencia de *R. robini* podría contribuir a su dispersión.

Con respecto a los nematodos, gran parte del interés que despiertan radica en su relación con los hongos, bacterias y virus. En las muestras recogidas en este estudio, la mayoría de los nematodos encontrados fueron parásitos de plantas (*A. blastophthorus*) o pertenecientes a grupos tróficos bacterívoros (Rhabditidae, *Acrobelloides* sp.) y fungívoros (*A. avenae*, *Aphelenchoides* sp.). Los nematodos fungívoros podrían permitir el control de hongos patógenos de plantas. Por ejemplo, el control de *Rhizoctonia solani*, un hongo patógeno importante en el azafrán, podría conseguirse mediante la aplicación del nematodo *A. avenae* (Ishibashi y Choi, 1991; Lootsma y Scholte, 1997; Lagerlof et al., 2011) y algunas especies de *Aphelenchoides* (Lagerlof et al., 2011). *A. avenae* está presente en todas las muestras, lo que sugiere la posible existencia de una relación hongo-nematodo. *A. blastophthorus*, considerado como plaga en plantas ornamentales y en cultivos como la fresa (EPPO, 2008), fue muy abundante en cormos en la plantación II de Blancas y II de Monreal del Campo (Tabla 4). Por ello, esta especie de-

bería ser objeto de un seguimiento y control estricto en el cultivo del azafrán. Por otro lado, en muestras de suelo y cormos no se han identificado especies pertenecientes a Trichodoridae y Longidoridae, familias de nematodos que incluyen especies vectores de algunos virus, lo cual es coherente con la ausencia de muestras infectadas por estos virus en este estudio. En consecuencia, aunque los virus TRV y ArMV están presentes en España (Abelleira et al., 2010; Melgarejo et al., 2010), la ausencia de sus vectores impide que actualmente representen un riesgo para los cultivos de azafrán en el valle del Jiloca.

Sin embargo, se han detectado dos potyvirus, BYMV y TuMV, bien en hojas o cormos recolectados en campos de azafrán, o bien en cormos manejados por los agricultores como material de propagación. En primer lugar, BYMV se ha detectado al menos en dos cormos tanto por serología como por inoculación experimental, en la que las reacciones locales observadas fueron compatibles con las esperables para este virus (Bos, 1970), a pesar de no obtener reacción sistémica en ningún huésped. Se han encontrado, con cierta frecuencia, inclusiones citoplásmicas características de la infección por BYMV y por otros potyvirus en plantas no sintomáticas de azafrán o de otras especies de *Crocus* (Russo et al., 1979; Pisi y Bellardi, 1990; Grilli Caiola y Faoro 2011). Este tipo de infección latente también se ha encontrado en *C. cartwrightianus*, una especie probablemente progenitora del azafrán, por lo que dichas infecciones podrían estar causadas por cepas atenuadas de potyvirus, seleccionadas en azafrán a través de fenómenos de coevolución huésped-patógeno a lo largo de repetidos ciclos de propagación vegetativa (Grilli Caiola y Canini, 2010; Grilli Caiola y Faoro, 2011). Tales infecciones latentes podrían estar relacionadas con la reducción de vigor y rendimiento observados en azafrán tras algunos años de cultivo (Grilli Caiola y Faoro, 2011). La ausencia de infección sistémica en

nuestras inoculaciones podría deberse a dichas cepas atenuadas de BYMV, que aunque detectadas por serología, no serían capaces de inducir una sintomatología sistémica aparente en azafrán o en el resto de huéspedes ensayados. En segundo lugar, se han detectado infecciones por TuMV en hojas y cormos de azafrán procedentes de campo, en cormos para propagación y en la especie arvensis *E. vesicaria*, confirmadas por serología y mediante inoculación experimental (Tabla 5), en la que se reprodujo la típica reacción inducida por este virus (Tomlinson, 1970). La infección de *E. vesicaria* es destacable, ya que esta especie se ha encontrado con una frecuencia considerable (57% de los campos) en las prospecciones de flora arvensis realizadas en este mismo trabajo, y por tanto, podría considerarse como un reservorio potencial de virus para subsiguientes infecciones del azafrán. Sin embargo, su densidad media cuando está presente en el campo es baja (0,3%), y su ciclo vegetativo no cubre el período de descanso vegetativo del azafrán, de modo que el propio azafrán, como huésped perenne (en su período vegetativo y geófito), se comportaría como un mejor reservorio para garantizar la supervivencia del virus que la especie arvensis durante la estación estival. Por tanto, el papel de *E. vesicaria* como reservorio de virus parece tener poca relevancia epidemiológica. Por otro lado, los eventos de transmisión de potyvirus por pulgones tendrían pocas oportunidades de ocurrir en azafrán, ya que la mayor parte de su ciclo vegetativo tiene lugar en invierno, con escaso solape con el período típico en que se darían los niveles máximos de población de pulgones. De hecho, no se han encontrado pulgones, ni siquiera en primavera, entre las especies de insectos identificadas en el área de estudio de este trabajo. Todo ello, unido a la detección directa de potyvirus en material de propagación, indica que el origen más probable de estas infecciones en azafrán es su propia propagación vegetativa, y que la infección por TuMV de *E. vesicaria* respon-

dería a un evento esporádico y puntual de transmisión vectorial desde el azafrán.

A pesar de las operaciones manuales y mecánicas de control de malas hierbas después de la recolección de las flores del azafrán, la cobertura del suelo continuó siendo considerable en primavera, lo que demuestra la poca capacidad de competencia de este cultivo y la necesidad de mejorar los métodos de control. La riqueza específica media encontrada en los campos de azafrán fue mucho mayor que la de los campos de cereal en la provincia de Teruel (13 frente a 4,7) (Cirujeda et al., 2011). Teniendo en cuenta que una menor riqueza específica suele estar asociada a zonas de manejo intensivo, los resultados indican que el azafrán se cultiva de una forma muy extensiva en la zona. El cultivo parece ser gestionado de forma más intensiva en Irán, donde predominan las especies de gramíneas, constituyendo el conjunto de gramíneas anuales y perennes el 72% de las especies de malas hierbas (Vafabakhsh, 2001). La mayor diversidad observada en el valle del Jiloca ofrece, *a priori*, mayores posibilidades de control (Rassam et al., 2011), ya que cuando en una zona dominan pocas especies éstas suelen estar muy bien adaptadas a las técnicas de manejo habituales, lo que dificulta su control.

La especie más frecuente, *L. amplexicaule*, fue la quinta especie más abundante, mostrando la necesidad de su control para evitar pérdidas de rendimiento del cultivo. No obstante, esta especie tiene un tamaño pequeño en comparación con el de *L. rigidum* y *D. sophia*, por lo que posiblemente compita menos que éstas. A pesar de su menor frecuencia y abundancia, *L. rigidum* y *D. sophia* probablemente sean más problemáticas debido a su elevada capacidad competitiva, como también lo son *C. arvense* y *P. rhoeas*. En efecto, *L. rigidum* es una de las especies de malas hierbas más importante en campos de cereal de invierno tanto en Aragón (Cirujeda et al.,

2011) como en el conjunto de España. Este hecho debería ser tenido en cuenta, ya que el azafrán se planta en rotación con cereal de invierno. Resulta llamativo que, a pesar de la distancia geográfica, *L. amplexicaule* y *D. sophia* fueron también clasificadas dentro del grupo de las 10 especies de más difícil control en este cultivo en dos de las tres regiones prospectadas en Irán, aunque en ese estudio las gramíneas más problemáticas fueron *Hordeum spontaneum* y *Bromus tectorum* (Shahrokhi et al., 2006). También Mesgaran et al. (2008) encontraron una mayor representación de gramíneas en plantaciones de azafrán en solitario respecto a aquellas en las que el azafrán estaba combinado con otro cultivo.

Los resultados obtenidos confirman la necesidad de acometer estudios multidisciplinarios, ya que se han detectado interacciones entre organismos potencialmente nocivos. Por ello es recomendable realizar el análisis de los cormos antes de ser replantados en nuevas parcelas con el fin de evitar la posible propagación de organismos nocivos para el cultivo. El ácaro *R. robini* que podría jugar un papel decisivo en la dispersión e incremento de daños causados por bacterias y hongos en el cormo, y puede ser detectado en el momento de la extracción del suelo. Las infecciones latentes por potyvirus podrían provocar reducciones prematuras de vigor en las plantaciones, por lo que se recomienda el análisis de al menos una muestra de los lotes de cormos destinados a la propagación. También es recomendable analizar el suelo de aquellas fincas de las que se vayan a extraer cormos, ya que la abundancia detectada del nematodo *A. blastophthorus*, considerado como plaga, hace que esta especie debiese ser objeto de un seguimiento y control estricto en el cultivo del azafrán del valle del Jiloca. Para prevenir posibles infecciones víricas es importante seguir los niveles poblacionales de trips y de otros insectos vectores de virus. La dominancia de especies de germinación

otoñal o primaveral, observada también por Mesgaran et al. (2008) en Irán, muestra que las tareas de desherbado en el área de estudio deben de ser efectuadas tanto en primavera como en otoño para evitar elevadas infestaciones, que pueden llegar incluso a ocasionar la muerte del cultivo (Kumar et al., 2009). Por tanto, se recomienda un desherbado inmediatamente después de la cosecha y otro en primavera, o bien mantener el suelo cubierto con algún tipo de acolchado o cubierta vegetal durante todo este período.

Dada la similitud climática y edáfica en todas las zonas productoras, que engloba como mínimo cinco países miembros de la UE y siete no pertenecientes a ella (Fernández et al., 2011), los resultados presentados en este trabajo resultarían de interés para todas ellas. No obstante, no se pueden descartar posibles diferencias en la presencia y/o abundancia de agentes patógenos entre las distintas zonas, por lo que sería muy interesante extender este tipo de estudios a estas otras áreas productoras de azafrán.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PET 2007-14-C05-01 del INIA. Agradecemos la valiosa asistencia técnica de J.A. Alins, F. Arrieta, A. Ardevines, I.M. Berruete, M.M. López, M.C. Pasamar, J.A. Royo e I. Tenas Pérez. Agradecemos a V. Iraola la ayuda para la identificación de ácaros, M.A. Alonso-Zarazaga de Curculionidae y A. Navas de nematodos.

Bibliografía

Abelleira A, Mansilla JP, Padilla V, Hita I, Cabaleiro C, Bertolini E, Olmos A, Legorburu FJ (2010). First report of *Arabis mosaic virus* on grapevine in Spain. *Plant Disease* 94: 635.

Beute MK, Benson DM (1979). Relation of small soil fauna to plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 17: 485-502.

Bos L (1970). Bean yellow mosaic virus. In: Descriptions of Plant Viruses on the web, no. 40. Association of Applied Biologists (Eds. D. Robinson, R. Mumford, M. Stevens, M. Adams). Disponible en <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=40> (31 agosto 2013).

CABI (2012). CABI Edition, CAB Int., Wallingford, Reino Unido. Disponible en <http://www.cabi.org/cpc> (12 mayo 2015).

Carretero JL (2004). Flora arvensis española. Phytoma, Valencia, España. 754 pp.

Cirujeda A, Marí AI, Aibar J, Fernández-Cavada S, Pardo G, Zaragoza C (2014). Experiments on mechanical weed control in saffron crops in Spain. *Journal of Plant Diseases and Protection* 121: 223-228.

Cirujeda A, Aibar J, Zaragoza C (2011). Remarkable changes of weed species in Spanish cereal fields from 1976 to 2007. *Agronomy for Sustainable Development* 31: 675-688.

Clark MF, Adams AN (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475-483.

Cooper I, Jones RAC (2006). Wild plants and viruses: under-investigated ecosystems. *Advances in Virus Research* 67: 1-47.

Díaz A, Okabe K, Eckenrode CJ, Villani MG, Oconnor BM (2000). Biology, ecology, and management of the bulb mites of the genus *Rhizoglyphus* (Acari: Acaridae). *Experimental and Applied Acarology* 24: 85-113.

DBIF (2013). Database of Insects and their Food Plants. Biological Record Center. Disponible en <http://www.brc.ac.uk/research.htm> (2 junio 2015).

EPPO (2008). Schemes for the production of healthy plants for planting PM 4/11 (2). Certification scheme for strawberry. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 38: 430-437.

Fernández JA (2004) Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Research Developments in Plant Science* 2: 127-159.

- Fernández JA, Santana O, Guardiola JL, Molina R-V, Heslop-Harrington P, Borbely G (y 34 autores más) (2011). The world saffron and *Crocus* collection: strategies for establishment, management, characterisation and utilisation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 125-137.
- Ferrence SC, Bendersky G (2004). Therapy with saffron and the goddess at Thera. *Perspectives in Biology and Medicine* 47: 199-226.
- Fiori M, Ligios V, Schiaffino A (2011). Identification of *Burkholderia* isolates obtained from bacterial rot of saffron (*Crocus sativus* L.) grown in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 450-461.
- Forsberg JL (1955). The use of insecticides as corm and soil treatments for control of bacterial scab of gladiolus. *Plant Disease Reporter* 39: 106-114.
- Forsberg JL (1959). Relationship of the bulb mite *Rhizoglyphus echinopus* to bacterial scab of gladiolus. *Phytopathology* 49: 538 (Abstract).
- Furuya N, Ura H, Liyama K, Matsumoto M, Takeshita M, Takanami Y (2002). Specific oligonucleotide primers based on sequences of the 16S-23S rDNA spacer region for the detection of *Burkholderia gladioli* by PCR. *Journal of General Plant Pathology* 68: 220-224.
- Ghorbani R, Koocheki A (2007). Organic saffron in Iran: prospects and challenges. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Saffron Biology and Technology*, Mashhad, Iran. *Acta Horticulturae* 739: 369-373.
- Gresta F, Lombardo GM, Siracusa L, Ruberto G (2008). Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 28: 95-112.
- Grilli Caiola M, Canini A (2010). Looking for saffron's parents (*Crocus sativus* L.). *Functional Plant Science and Biotechnology* 4, Special Issue 2: 1-14. Disponible en http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/Sample/FPSB_4%28SI2%291-14o.pdf (15 mayo 2015).
- Grilli Caiola M, Faoro F (2011). Latent virus infections in *Crocus sativus* and *Crocus cartwrightianus*. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 175-182.
- Hildebrand DC, Palleroni NJ, Doudoroff M (1973). Synonymy of *Pseudomonas gladioli* Severini 1913 and *Pseudomonas marginata* (McCulloch 1921) Stapp 1928. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23: 433-437.
- Ishibashi N, Choi DR (1991). Biological control of soil pest by mixed application of entomopathogenic and fungivorous nematodes. *Journal of Nematology* 23: 175-181.
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Klement Z, Goodman RN (1967). The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 5: 17-44.
- Kumar R, Singh V, Devi K, Sharma M, Sing MK, Ahuja PA (2009). State of the art of saffron (*Crocus sativus* L.) agronomy: a comprehensive review. *Food Reviews International* 25: 44-85.
- Lagerlof J, Insunza V, Lundegardh B, Ramert B (2011). Interaction between a fungal plant disease, fungivorous nematodes and compost suppressiveness. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science* 61: 372-377.
- Lootsma M, Scholte K (1997). Effects of the springtail *Folsomia fimetaria* and the nematode *Aphelenchus avenae* on *Rhizoctonia solani* stem infection of potato at temperatures of 10 and 15°C. *Plant Pathology* 46: 203-208.
- MAGRAMA (2013). Anuario de Estadísticas Agrarias, 2012. Disponible en http://www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2011/AE_2011_12.pdf (1 abril 2015).
- Melgarejo P, Garcia-Jimenez J, Jorda MC, Lopez MM, Andres MF, Duran-Vila N (Eds) (2010). Patógenos de plantas descritos en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, Spain.
- Mesgaran M, Mashhadi HR, Khosravi M, Zand E, Mohammad-Alizadeh H (2008). Weed community response to saffron-black zira intercropping. *Weed Science* 56: 400-407.
- Okabe K, Amano H (1991). Penetration and population growth of the robine bulb mite, *Rhizoglyphus robini* Claparède (Acari: Acaridae), on healthy and *Fusarium*-infected rakkyo bulbs. *Applied Entomology and Zoology* 26: 129-136.

- Pérez Bueno M (1989). El azafrán: cultivo, enfermedades, rendimientos, industrialización. Colección Agroguías Mundi-Prensa, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, 155 pp.
- Pisi A, Bellardi G (1990). Ultrastructural study of cytoplasmic inclusions in plants infected with Potyviruses. *Journal of Phytopathology* 130: 114-118.
- Poe SL, Noble WE, Stall RE (1979). Acquisition and retention of *Pseudomonas marginata* by *Anoetus feroniarum* and *Rhizoglyphus robini*. En: Recent advances in acarology (Ed. JG Rodriguez), pp. 119-124. Academic Press, Nueva York, EE.UU.
- Rassam G, Latifi N, Soltani A, Kamkar B (2011). Impact of crop management on weed species diversity and community composition of winter wheat fields in Iran. *Weed Biology and Management* 11: 83-90.
- Russo M, Martelli GP, Cresti M, Ciampolini F (1979). Bean yellow mosaic virus in saffron. *Phytopathologia Mediterranea* 18: 189-191.
- Shahrokhi MB, Rahimi H, Rashed MH (2006). Chapter 6: saffron pests, diseases and weeds. En: Saffron (*Crocus sativus*) production and processing (Eds. M. Kafi, A. Koocheki, MH Rashed, M. Nasiri), pp. 91-109. Science Publishers, EE.UU.
- Soufizadeh S, Zand E, Baghestani MA, Sheibany K (2007). Integrated weed management in saffron (*Crocus sativus*). Proceedings of the IInd International Symposium on Saffron Biology and Technology, Mashhad, Iran. *Acta Horticulturae* 739: 369-373.
- Tomlinson JA (1970). Turnip mosaic virus. En: Descriptions of plant viruses on the web, no. 8. Association of Applied Biologists (Eds. D. Robinson, R. Mumford, M. Stevens, M. Adams). Disponible en <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=8> (31 agosto 2013).
- Vafabakhsh K (2001). The effects of chemical and mechanical control of weeds in saffron fields on dynamics and productivity of weeds and saffron. BCPC International Conference on Weeds, 12-15 noviembre de 2001, Brighton, Inglaterra. British Crop Protection Council, pp. 329-332.
- Xu CX, Ge QX (1990). A preliminary study on corm rot of *Crocus sativus* L. *Acta Agriculturae Universitatis Zhejiangensis* 16 (Suppl. 2): 241-246.
- Young RA (1954). Fungicide-insecticide mixtures in preplanting corm treatments for control of bacterial scab of gladiolus. *Plant Disease Reporter* 38: 55-56.

(Aceptado para publicación el 14 de septiembre de 2015)