



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Máster en Ingeniería Agronómica

Estudio de aislados no patogénicos de
Fusarium oxysporum para el control biológico
de patógenos fúngicos oportunistas.

Alumno: Víctor Arroyo Gallardo

Tutor: Fernando Manuel Alves Santos

Septiembre de 2015

Copia para el tutor

Deseo agradecer:

A mi tutor, el Dr. Fernando Manuel Alves Santos, porque más que un tutor, ha sido un amigo y es una persona excepcional de principio a fin. Sin su constante apoyo y preocupación esta aventura no habría sido la misma. Trabajar bajo su tutela ha sido todo un placer.

A D. Manuel García Zumel, por permitirme disponer del laboratorio de Fitopatología para realizar todos los ensayos del estudio.

Al Departamento de Producción Vegetal (Recursos Forestales), en especial a los responsables del Laboratorio de plagas y enfermedades forestales, por dejarme utilizar dicho laboratorio para la preparación de los medios que he empleado en mi trabajo.

A todos mis amigos y muy especialmente a Raúl, que me han tendido su brazo y que han estado ahí cuando más los he necesitado.

A mi familia (en especial mi padre y mi madre), que a pesar de nombrarlos en última posición, son mi más grande y principal apoyo y las personas más importantes en mi vida.

ÍNDICE

	Pág.
1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. Generalidades hongos oportunistas.....	7
2.1.1. <i>Botrytis cinérea</i>	8
2.1.2. <i>Alternaria</i>	10
2.1.3. <i>Cladosporium</i>	11
2.1.4. <i>Mucor</i>	13
2.1.5. <i>Penicillium</i>	14
2.1.6. <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus niger</i>	15
2.2. Descripción de los aislados no patogénicos de <i>Fusarium oxysporum</i>	16
2.3. El Control Biológico.....	20
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAL Y MÉTODOS	29
4.1. Obtención de aislados.....	29
4.2. Análisis de la competencia de los aislados en placa de PDA	30
4.3. Efecto de filtrados de cultivos de aislados no patógenos sobre la germinación de esporas de aislados patógenos.....	31
4.4. Efecto sobre la germinación de semillas de judía de la presencia conjunta del patógeno y los no patógenos.....	34
4.5. Ensayos in vivo sobre material vegetal (naranjas).....	36
4.5.1. Ensayo de coinoculación con los aislados patógenos y los aislados no patógenos	37
4.5.2. Valoración de los daños en naranja	38
4.6. Análisis estadístico.....	39

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1. Análisis de la competencia de los aislados en placa de PDA	43
5.2. Efecto de filtrados de cultivos de aislados no patógenos sobre la germinación de esporas de aislados patógenos.....	46
5.3. Efecto sobre la germinación de semillas de judía de la presencia conjunta del patógeno y los no patógenos.....	49
5.4. Ensayos in vivo sobre material vegetal (naranjas).....	55
6. CONCLUSIONES	67
7. BIBLIOGRAFÍA.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Aislados utilizados en el estudio	29
Tabla 2: Tabla ilustrativa de todos los emparejamientos posibles y sus respectivas repeticiones	31
Tabla 3: Tabla ilustrativa del total de tubos eppendorf con la mezcla del filtrado no patógeno-esporas patógeno	33
Tabla 4: Tabla ilustrativa del total de placas formadas por las combinaciones de semillas con los aislados patogénicos y no patogénicos	35
Tabla 5: Tabla ilustrativa del total de naranjas empleadas en éste ensayo	36
Tabla 6: Test LSD en los Valores del índice “Crecimiento Patógeno/Crecimiento No Patógeno”	43
Tabla 7: Análisis de Varianza para enfrentamientos	44
Tabla 8: Test LSD en los valores de la variable “porcentaje de germinación” SIN NP= sin no patógeno.....	47
Tabla 9: Análisis de Varianza para Germinación de Esporas	47
Tabla 10: Valores de la variable “germinación semillas”	50
Tabla 11: Análisis de Varianza para germinación de semillas	51
Tabla 12: Valores de la variable “viabilidad semillas”	52
Tabla 13: Análisis de Varianza para viabilidad semillas	53
Tabla 14: Medida de diámetro de lesión 10 días	56
Tabla 15: Análisis de Varianza para lesión a los 10 días.....	57
Tabla 16: Medida de diámetro de lesión 30 días.....	60
Tabla 17: Análisis de Varianza para lesión a los 30 días	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Macro y microconidios de <i>F. oxysporum</i> (200x)	17
Figura 2: Colonia de <i>F. oxysporum</i> en medio PDA.....	18
Figura 3: Placa con emparejamiento de patógeno N4 y no patógeno AB62.....	30
Figura 4: Recolección de de las secreciones producidas por el aislado no patógeno (en la foto el AB92)	32
Figura 5: Tubos eppendorf con la mezcla del filtrado no patógeno-esporas patógeno.....	33
Figura 6: Placa con las cinco semillas de judía.	34
Figura 7: Tubos con la suspensión esporal.....	37
Figura 8: Total de combinaciones en ensayo de coinoculación de naranjas	38
Figura 9: Valores medios de los aislados no patógenos en el índice Patógeno/No patógeno.....	44
Figura 10: Valores medios de los aislados patógenos en el índice Patógeno/No patógeno.....	45
Figura 11: Valores medios de los aislados no patógenos en la variable “porcentaje de germinación” de esporas.....	48
Figura 12: Valores medios de los aislados patógenos en la variable “porcentaje de germinación” de esporas.....	48
Figura 13: Valores medios de los aislados no patógenos en la variable “viabilidad de semillas” germinadas.	53
Figura 14: Valores medios de los aislados patógenos en la variable “viabilidad de semillas” germinadas.....	54
Figura 15: Lesiones a los 10 días en la combinación <i>Penicillium</i> -no patógeno.....	56
Figura 16: Valores medios (en mm) de las distintas combinaciones en la variable “lesión 10 días”.....	58
Figura 17: Lesiones a los 30 días en la combinación <i>Botrytis</i> -no patógeno.....	59
Figura 18: Valores medios de las distintas combinaciones en la variable “lesión 30 días”	61

Estudio de aislados no patogénicos de *Fusarium oxysporum* para el control biológico de patógenos fúngicos oportunistas.

Alumno/a: Víctor Arroyo Gallardo.
Universidad de Valladolid (Campus de Palencia). E.T.S. Ingenierías Agrarias.
Titulación de: Máster en Ingeniería Agronómica.

1. RESUMEN

Los hongos oportunistas afectan numerosas especies vegetales tanto en los cultivos como en productos cosechados y almacenados. Este tipo de enfermedades provocadas por hongos son muy difíciles de combatir mediante el empleo de fitosanitarios. La aplicación de los mismos se encuentra muy limitada y es especialmente importante en productos destinados a consumo donde existen límites de residuos y plazos de seguridad que deben respetarse. Asimismo, el Real Decreto 1311/2012, de 14 de Septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios indica que “Los métodos sostenibles biológicos, físicos y otros no químicos deberán preferirse a los métodos químicos”.

Por ello, en el presente estudio planteamos el control biológico como alternativa.

Trabajos previos han mostrado la eficiencia de los aislados no patogénicos de *F.oxysporum* en el control de enfermedades como la fusariosis vascular. El planteamiento del trabajo es evaluar mediante pruebas in vitro y pruebas in vivo la posibilidad de emplear estos aislados en control biológico de enfermedades producidas por hongos necrotrofos oportunistas.

Para conseguir este objetivo, trabajamos con siete aislados no patogénicos de *Fusarium oxysporum*. Estos aislados son aislados de crecimiento saprofito asociados a cultivos de judía y que han probado su eficiencia en control de la fusariosis vascular tanto de judía como en planta de tabaco. Por ello se han planteado evaluar su espectro de acción frente a otro tipo de patógenos para su posible uso como agentes de control biológico. Se han empleado como patógenos oportunistas siete especies de conocida importancia: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Botrytis*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*.

Siguiendo la experiencia de trabajos anteriores se ha evaluado la competencia de estos aislados tanto en medio artificial (PDA) como sobre sustrato vegetal (semillas de judía y naranja). Del mismo modo se ha comprobado la posible producción de sustancias de carácter antibiótico mediante el estudio de la inhibición de la germinación de esporas de los patógenos.

En los ensayos in vitro y sobre semillas de judía se realizaron todas las combinaciones posibles con resultados diversos pero sin encontrar un patrón de

comportamiento que pudiese resultar útil en control biológico. Las diferencias estadísticas vinieron marcadas por la diferente naturaleza de los patógenos utilizados y no por el efecto de algunos no patógenos aunque algunas combinaciones pareciesen prometedoras. De forma similar los ensayos sobre naranjas que se hicieron con *Botrytis*, *Penicillium* y *Alternaria* presentaron resultados contradictorios y algunos de los aislados no patogénicos que parecían ejercer una influencia positiva en el control de *Botrytis* ejercían el efecto contrario con los otros dos patógenos aumentando significativamente los daños.

La conclusión de este trabajo indica que a pesar del efecto positivo de estos aislados no patogénicos de *Fusarium oxysporum* sobre la fusariosis vascular, no es aconsejable su uso para enfermedades oportunistas o postcosecha ya que estos aislados en vez de controlar la enfermedad podrían comportarse a su vez como oportunistas produciendo un efecto sinérgico incrementado los daños.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. GENERALIDADES HONGOS OPORTUNISTAS

Los hongos oportunistas se definen desde el punto de vista humano como una serie de patógenos que provocan infecciones oportunistas que en condiciones normales no afectan a las personas y se circunscriben a aquellas cuyo sistema inmunitario está debilitado. Los agentes productores de este variado espectro de afecciones incluyen un amplio espectro de géneros y especies que año a año se va incrementado considerablemente. Estos son saprófitos de suelo, agua, aire y vegetales, abundan en restos de materia orgánica en descomposición y anteriormente consideradas inocuos, contaminantes de laboratorio, relegados a la fitopatología o a procesos industriales (Giusiano, G.E. web).

Desde el punto de vista de la fitopatología podemos definir a los oportunistas a aquellos organismos que desarrollando un modo de vida saprofítico pueden provocar daños en las plantas si se producen la circunstancias necesarias y favorables. Estas pueden ser condiciones ambientales como temperatura o humedad o estados de susceptibilidad de la planta incluyendo las posibles heridas que pueden servirles de vi de entrada.

Aunque el término oportunista es de frecuente uso por su facilidad de comprensión es más correcto usar el término necrotrofo para indicar el tipo de interacción del patógeno y la planta.

Los patógenos necrotróficos causan las principales enfermedades en pre y postcosecha en numerosos cultivos de importancia agronómica provocando pérdidas económicas significativas. En contraste con los biotrofos, parásitos obligados de plantas obligados que infectan y se alimentan de las células vivas, los necrótrofos destruyen las células del huésped para alimentarse de sus contenidos. (Laluk y Mengiste, 2010).

Los patógenos necrotróficos varían desde los que son específicos que infectan sólo una especie o un número pequeño de especies relacionadas, a los que son capaces de causar enfermedad en cientos de especies que pertenecen a diferentes familias. En consecuencia, las pérdidas esperadas por estas enfermedades son muy altas aunque estadísticamente sean difíciles de cuantificar.

En el presente Trabajo Final de Máster, hemos empleado siete especies diferentes hongos oportunistas, de los cuales presentaremos las generalidades a continuación. Hay que destacar dentro de estas especies por su importancia

económica *Botrytis cinerea* y *Alternaria* tanto en pre como postcosecha, así como *Mucor* sobre producto recolectado y los más oportunistas en el sentido estricto del significado como *Penicillium*, *Aspergillus flavus*, *A. niger* y *Cladosporium* que además pueden producir micotoxinas. Por otro lado hemos usado aislados de *Fusarium oxysporum* que han sido eficientes en control biológico en trabajos anteriores (Bermejo, 2008; Arroyo, 2012) aunque esta especie también puede tener comportamiento necrotrófico oportunista.

2.1.1. **BOTRYTIS CINEREA**

Botrytis cinerea es un hongo filamentoso responsable de la enfermedad conocida como podredumbre gris. La enfermedad ha recibido este nombre por el aspecto aterciopelado y la coloración grisácea que adquieren los tejidos a los que afecta y sobre los cuales esporula abundantemente (Santander, 2014).

Es un hongo que puede vivir como saprófito sobre tejidos muertos pero también tiene un carácter polífago sobre plantas vivas. Se conoce que infecta a más de 200 especies de plantas y es considerado un organismo necrótrofo “modelo” (Van Kan, 2006), es decir que primero mata a las células de la planta huésped para luego colonizar el tejido muerto. Dentro del amplísimo rango de especies a las cuales *B. cinerea* infecta encontramos a cultivos de dicotiledóneas de gran interés económico a nivel mundial. *B. cinerea* ha sido considerado el segundo hongo fitopatógeno más importante en la patología molecular de plantas (Dean *et al.*, 2012).

B. cinerea es un hongo complicado de controlar porque posee una amplia variedad de factores y mecanismos de patogenicidad que le permiten atacar a la planta huésped de formas diferentes. Por otra parte, pudiendo infectar a tantos huéspedes diferentes, las fuentes de inóculo pueden ser muy diversas. Además, puede sobrevivir tanto en estadio de espora como de micelio y por largos periodos en forma de esclerocios en desechos de cultivos. Puede desarrollarse en casi todos los climas, por lo cual es considerado un hongo ubicuo (Santander, 2014).

B. cinerea es un hongo descrito por Anton de Bary en 1886 y clasificado como ascomicete debido a que exhibe la estructura típica descrita para éste taxón. Los conidióforos miden de 1 a 3 mm de largo y se dividen en numerosas ramas para terminar en una célula apical alargada donde se producen los conidios, estructuras con forma redondeada pero ligeramente elíptica que presentan un cuello corto y miden 10x8,5 µm (Pezel and Pont, 1990, en Santander, 2014). El micelio que se forma a

partir de ellas es de color marrón oliva formado por hifas con un diámetro de entre 11 a 22 μm .

Los esclerocios son estructuras que se forman a partir de micelio en condiciones ambientales o climáticas desfavorables. Tienen forma discoidal o esférica y son estructuras melanizadas de color negro formada por hifas fuertemente entrelazadas que pueden medir entre 2-4 x 1-3 mm. Son generalmente consideradas como un medio fundamental para la supervivencia de *B. cinérea* (Santander, 2014).

La capacidad de *B. cinerea* para infectar diferentes tipos de plantas y tejidos bajo diversas condiciones ambientales, así como su habilidad de sobrevivir en el suelo por mucho tiempo mediante la formación de esclerocios, contribuyen a su amplia y persistente presencia en la naturaleza.

B. cinerea es un hongo cuyo ciclo de vida posee dos fases: una sexual, representada por el teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* y cuya presencia en la mayoría de los cultivos ha sido muy raramente reportada; y una fase asexual que es la que encontramos en la naturaleza y que es la que manejamos habitualmente en todos los experimentos de laboratorio.

De manera general, el ciclo de infección de *B. cinerea* sobre la planta huésped comienza cuando los conidios alcanzan su superficie. Si las condiciones son las adecuadas, éstos germinan adhiriéndose fuertemente a la superficie de las células vegetales mediante los apresorios (Santander, 2014).

El control del hongo *B. cinerea* es una tarea difícil por diversas razones entre las que podemos mencionar la gran variedad de modos de ataque de los cuales puede hacer uso, el gran número de huéspedes que puede infectar y su enorme capacidad para sobrevivir y dispersarse eficientemente en forma de micelio, conidio o esclerocio en el caso de que las condiciones climáticas no sean óptimas para su desarrollo.

Hasta el momento las estrategias utilizadas para el control de la podredumbre gris se pueden agrupar en 5 categorías: control químico, control biológico, prácticas y métodos culturales, métodos de estimulación de las respuestas de defensa de la planta y la mejora genética de la resistencia a la enfermedad.

2.1.2. ALTERNARIA

Alternaria es un género fúngico muy común, donde se incluyen numerosas especies patógenas y saprofitas ampliamente distribuidas en el suelo y la materia orgánica en descomposición. Como saprofito, *Alternaria* spp. persiste en forma de micelio durante los inviernos, y bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura produce conidios que se diseminan con la ayuda del viento, agua, insectos, etc. Los conidios de *Alternaria* que colonizan las plantas, germinan e infectan las hojas, tallos o frutos, donde provocan lesiones de diversa consideración según la intensidad de la infección.

El género *Alternaria* fue descrito por Nees en 1817, con *A. alternata* (originariamente *A. tenuis*) como especie tipo. Debido a la ausencia de un ciclo de reproducción sexual, este género se clasificó dentro del filo de hongos imperfectos o mitospóricos. *Alternaria* spp. se caracteriza por la producción de conidióforos simples y erectos, en cuyo extremo se forman cadenas simples o ramificadas de conidios. Los conidios son multicelulares, de color pardo y con septos tanto transversales como longitudinales (Pavón, 2013).

Se han identificado alrededor de 300 especies en el género *Alternaria*, que se clasifican en grandes grupos atendiendo a las características de los conidios (Simmons, 2007, en Pavón 2013):

1) Conidios grandes: en este grupo se incluyen especies productoras de conidios alargados, generalmente solitarios, caracterizados por la presencia de un apéndice terminal de tamaño heterogéneo, en ocasiones ramificado y/o filamentosos. En este grupo se engloban especies como *A. cucumerina*, *A. brassicae*, *A. dauci*, *A. limicola*, *A. macrospora*, *A. porri*, *A. solani* y *A. sonchi*.

2) Conidios pequeños: en este grupo se incluyen especies productoras de conidios esféricos, ovoides o elipsoides, sin apéndices terminales, solitarios o formando cadenas (simples o ramificadas). La identificación morfológica de este grupo, basada en la formación de los conidios, es muy compleja. Por este motivo, para facilitar la identificación, las especies de *Alternaria* se han clasificado en cinco grandes grupos atendiendo a su modelo de esporulación: *A. radicina*, *A. tenuissima*, *A. alternata*, *A. arborescens* y *A. infectoria*.

El hongo puede sobrevivir en el suelo, en residuos de cultivos infestados y malezas. El hongo puede sobrevivir en semillas y este es dispersado con la ayuda del viento, agua, insectos, trabajadores y maquinaria agrícola. Las esporas pueden

penetrar las hojas, tallos o frutos. El hongo es más activo cuando ocurren temperaturas moderadas o calientes y el ambiente está húmedo. Esta enfermedad es mayor problema en la época lluviosa (Pavón, 2013).

Este puede ahogar las plántulas causando mal del talluelo (damping-off) en el semillero. En las hojas se presentan pequeñas manchas circulares de color café frecuentemente rodeadas de un halo amarillo. Las manchas tienen la característica de tener anillos concéntricos de color oscuro. Usualmente las manchas aparecen en las hojas más viejas y de éstas suben al resto de la planta. A medida que la enfermedad progresa, el hongo puede atacar los tallos y las frutas. Las manchas en las frutas son similares a las de las hojas con color café y anillos concéntricos oscuros. En los anillos concéntricos se producen esporas polvorientas y oscuras. Las esporas se pueden observar si a la lesión se le acerca un objeto de coloración clara (Pavón, 2013).

Para el control, procurar brindar condiciones adecuadas para un crecimiento vigoroso durante toda la temporada, especialmente en la irrigación y la fertilización en los lados. La aspersión del follaje con fungicidas orgánicos reduce la diseminación del tizón temprano. La resistencia se encuentra entre las variedades de maduración tardía. Son también importantes medidas de control la rotación de cultivos, el uso de semilla desinfectada y sana y las aplicaciones de productos fungicidas en forma preventiva cuando existen las condiciones ambientales favorables.

2.1.3. CLADOSPORIUM

Género perteneciente al Orden *Moniliales*, Subdivisión *Deuteromycotina* que engloba a unas 40 especies, algunas de ellas fitopatógenas y la mayoría saprofitas sobre vegetación o sobre el suelo; algunas de sus especies son capaces de atacar celulosa, pectina y lignina. Es un género de distribución cosmopolita, siendo uno de los taxones más aislado y abundante en los recuentos aerobiológicos de todo el mundo. Es ampliamente citado como productor de asma y esporosis, e incluso algunas de sus especies actúan como oportunistas y son capaces de intervenir en ciertos procesos micóticos pulmonares, atacar la piel, producir cromoblastomycosis y lesiones neurotrópicas. Aunque el mayor interés por estos hongos, desde el punto de vista sanitario, viene dado por la capacidad alergógena de sus conidios, que pueden alcanzar en la atmósfera, tanto en interiores como en exteriores de edificaciones, concentraciones muy altas (García-Pantaleón, F.I y Mediavilla Molina, A. Recurso web).

Cladosporium (teleomorfo: *Mycosphaerella*) forma en cultivo colonias de color oliváceo y a veces grises o marrones; aterciopeladas, flocosas o pelosas; a veces presenta estromas. Sus conidióforos son simples o poco ramificados, con una coloración marrón o verdosa, y de superficie lisa o ligeramente granulosa en algunas especies. Pueden ser de forma variada (elipsoidales, limoniformes, oblongos, esféricos, subesféricos, fusiformes), con una cicatriz en la base y pueden ser unicelulares o poseer 1-3 septos transversales; poseen pared lisa, verrugosa o equinada, hialina a pigmentada, de color oliváceo a marrón oscuro. Los conidios de *Cladosporium* pueden aparecer encadenados o solitarios. Poseen un tamaño aproximado de 3-7 x 2-4 micras, son reconocibles por las características de color y forma comentadas en la descripción anterior y por la presencia de una cicatriz en la base.

En la mayoría de las Comunidades que forman nuestro país, los conidios de *Cladosporium* están presentes en el aire de interior y exterior durante todo el año, las mayores concentraciones se alcanzan durante el final del verano y principios del otoño, alcanzándose en ocasiones niveles muy altos (García-Pantaleón, F.I y Mediavilla Molina, A. Recurso web).

En plantas, si bien los efectos más graves los provoca sobre fruto, también se manifiesta sobre ramas y hojas. En la región del pedúnculo muestra manchas pequeñas, circulares, al principio grisáceas, indefinidas, que luego se tornan de color oliváceo a oscuro con bordes bien definidos. Finalmente el área afectada se resquebraja permitiendo la entrada de otros patógenos principalmente *Monilinia*.

El hongo inverna en las lesiones de las ramas afectadas. En la primavera los conidios son propagados por el viento a los frutos produciendo la infección.

El método más eficiente para el control es el uso de cultivares resistentes y el principal método de control es el químico. También destacar el control biológico de *Cladosporium* mediante el uso de *Trichoderma*. (Elad, 2003)

2.1.4. MUCOR

Mucor es un hongo filamentoso perteneciente a la clase Zygomycetes, dentro del orden Mucorales. La clase Zygomycetes incluye más de 3000 especies conocidas, las cuales se pueden encontrar por todo el mundo en diferentes ambientes y circunstancias. Todas las especies incluidas en esta clase se caracterizan por una reproducción sexual mediante la producción de zigosporas, unas esporas únicas que se forman por la fusión de dos gametangios (hifas especializadas). La mayor parte de los zigomicetos son organismos sincitiales que carecen de septos, es decir, forman una única célula multinucleada. Esta única célula, en un momento determinado, emite unas hifas aéreas únicas o ramificadas en cuyos extremos se forman los esporangios, normalmente globosos, que contienen las esporas asexuales. *Mucor* es un género que engloba a las especies causantes del moho que comúnmente se encuentra en aceite, plantas y vegetales echados a perder. Las colonias de este género son normalmente de color blanco o con cierto tono beige, aunque se vuelven de color gris o marrón con el tiempo debido a la maduración de sus esporas (Jordán, 2013).

Las especies de *Mucor* producen grandes cantidades de enzimas que les permiten crecer sobre una amplia variedad de alimentos, así como superficies vegetales en descomposición. *Mucor* presenta dos ciclos de vida diferente, uno asexual y otro sexual. El ciclo sexual permite la recombinación genética, apareciendo nuevas combinaciones en la descendencia, mientras que el ciclo asexual permite la reproducción rápida del microorganismo.

Las esporangiósporas son *mitosporas* asexuales (formadas vía mitosis) producidos dentro de los esporangios lanzados cuando maduran por la desintegración de la pared.

La reproducción sexual ocurre cuando dos tipos de micelio compatibles (mating types) llegan a una proximidad estrecha, induciendo la formación de hifas especializadas llamadas gametangios. Los gametangios crece uno pegado al otro, y luego se fusionan, formando un cigoto diploide que evoluciona hasta la zygospora (diploide). Posteriormente la zygospora sufre meiosis y germina formando un esporangio que cierra el ciclo (Jordán, 2013). Entre los métodos de prevención y control estarían: manipular cuidadosamente los productos postcosecha, evitar almacenar frutos húmedos en su superficie, separar los frutos que muestren signos de enfermedades para evitar la contaminación y productos químicos que se pueden usar sin restricción (limpieza instalaciones, etc.).

2.1.5. *PENICILLIUM*

Es un género de hongos conocidos como mohos verdes o azules; de algunas especies se obtiene la penicilina. El micelio del hongo, conjunto de filamentos tubulares llamados hifas, crece en la superficie de frutas, pan, quesos y otros alimentos. La reproducción asexual se produce en *Penicillium* mediante los conidios, que se forman en el extremo de hifas especializadas, los conidióforos. Éstos son ramificados y en forma de abanico. Hongo donde nacen conidios lisos, elipsoidales (de 2,5-4 μm) azules o verde-azulados en cadenas, sin ramificar, como un penacho o pincel característico. Colonias de crecimiento rápido, vellosas, aterciopeladas, verdosas con una corona radial ancha y blanca. Puede haber gotas de exudado sobre la superficie de la colonia. Reverso habitualmente amarillento o cremoso. Esporulación abundante. Olor aromático, especiado o afrutado (a manzana o a piña).

Penicillium es un género ubicuo, siendo comúnmente el género de hongos más abundante en suelos. La fácil proliferación de *Penicillium* en alimentos es un serio problema. Algunas especies producen toxinas y pueden hacer el alimento no comestible incluso peligroso. El micelio del hongo, conjunto de filamentos tubulares llamados hifas, crece en la superficie de frutas, pan, quesos y otros alimentos. Es una buena práctica desechar los alimentos que demuestran el desarrollo de cualquier moho. No muestra una notable variación estacional. Las máximas concentraciones de conidios en el aire se alcanzan en invierno y primavera (mayores en las áreas urbanas que en las rurales). Su temperatura óptima de crecimiento es de 23 C°, pero crece entre 5 y 37 C°.

La utilización de productos químicos de síntesis es el sistema más usado para su control, pero actualmente cada vez son mayores las objeciones de orden higiénico-sanitarias que éstos plantean cuando son aplicados en las frutas y verduras.

En los últimos años la utilización de levaduras y bacterias como agentes de biocontrol es una alternativa muy estudiada (Dpto. de Protección Vegetal. Univ. de la República. Uruguay, recurso web).

2.1.6. ASPERGILLUS FLAVUS Y ASPERGILLUS NIGER

Aspergillus es un hongo filamentoso hialino, saprofito, perteneciente a la subdivisión Ascomycotina. Se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios).

Las diferentes especies se diferencian en tamaño, tasa de crecimiento, textura (aterciopelada, granular, algodonosa) y color de la colonia: verde-amarillento (*A. flavus*), negro (*A. niger*), marrón (*A. terreus*). La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales. *Aspergillus* es junto a *Penicillium* uno de los principales hongos productores de micotoxinas (Mirón *et al.* 2014).

Crece en cualquier tipo de sustrato, especialmente en suelos y materiales en descomposición. Es un contaminante habitual de los conductos de climatización-ventilación. Es termotolerante, puede vivir entre los 12°C y los 57°C.

La transmisión se produce principalmente por medio de las esporas o conidios que se encuentran presentes en el ambiente de trabajo en forma de bioaerosoles y penetran en el organismo por vía respiratoria. También es posible la transmisión por contaminación de heridas o mucosas y la aparición de efectos tóxicos por ingestión de alimentos contaminados. Son responsables de casos de enfermedad nosocomial. No se produce transmisión de persona a persona.

Es un patógeno oportunista que causa infecciones locales y superficiales como las micosis (otomicosis, onicomiosis, queratitis) y el aspergiloma o bola fúngica que se desarrolla en una cavidad como en una lesión pulmonar, producida por una enfermedad pulmonar previa o en un seno nasal. En individuos con el sistema inmunitario debilitado, *A. flavus* y *A. terreus* pueden producir infecciones invasivas, como la aspergilosis invasiva diseminada, que cursa de forma grave con neumonía, afectando al pulmón y pudiéndose diseminar a otros órganos.

En cuanto a la prevención y el control, se utilizan como agentes desinfectantes el hipoclorito sódico y sulfato de cobre, y como agentes antimicrobianos el Voriconazol y anfotericina B (Mirón *et al.* 2014).

La especie *A.flavus* es de color verde-amarillo. La textura de las colonias es pulverulenta con surcos radiales, rugosas o granuladas, ocasionalmente algodonosas en el centro o margen de la colonia. El reverso de la colonia es incoloro.

Los conidióforos no ramificados de pared gruesa, hialinos, rugosos, de ≥ 1 mm de longitud y de 10 a 20 μm de diámetro. Las vesículas son globosas o subglobosas de 10 a 65 μm de diámetro produciendo fiálidas uni o biseriadas alrededor de la vesícula. Los conidios son de color verde amarillentos, lisos o finamente rugosos, esféricos o subesféricos con un diámetro de 3,5 a 4,5 μm .

La especie *A.niger* presenta color de las colonias blanco a amarillo y evoluciona al madurar hacia, negro. La textura de las colonias es granular. El reverso de la colonia es incoloro o crema.

Los conidióforos son de pared lisa, hialina o pigmentada y miden de 1,5 a 3 mm de largo y de 15 a 20 μm de diámetro. La vesícula es globosa con 50-100 μm de diámetro y produce fiálidas alrededor de ella. Las fiálidas son biseriadas, las ramas primarias miden 30 μm de largo y pueden estar tabicadas, mientras que las secundarias son cortas y miden 8 μm de longitud, a partir de las cuales brotan los conidios, los cuales son globosos y rugosos con 4 a 5 μm de diámetro, de color castaño o marrón a negro. (Ministerio de Salud de Perú, 2010)

2.2. DESCRIPCIÓN DE LOS AISLADOS NO PATOGENICOS DE *FUSARIUM OXYSPORUM*

Fusarium oxysporum Schlecht. pertenece al reino *Fungi*, a la división Eumycota (hongos verdaderos), subdivisión Deuteromycotina (hongos imperfectos), clase Hyphomycetes, orden Hyphales, familia Tuberculariaceae y sección *Elegans*.

Los hongos pertenecientes a la subdivisión Deuteromycotina son aquellos que carecen de estructuras de reproducción sexual o hasta el momento no se han observado. Existen algunas especies del género *Fusarium* donde si se conoce un estado perfecto o sexual (teleomorfo) y que tiene otro nombre, tal es el caso de *F. solani* (anamorfo) y *Nectria haematococca* (teleomorfo) y *F. verticillioides* (= *F. moniliforme*) (anamorfo) y *Gibberella fujikuroi* (teleomorfo). En la reproducción asexual o fase anamórfica de este hongo se aprecian dos tipos diferenciados de conidios: macroconidios y microconidios (Figura 1); ambos se forman a partir de células conidiógenas formadas en conidióforos cortos, de tipo monofiálidas (James & Baker, 1983). También es frecuente la presencia de esporas de resistencia llamadas

clamidosporas que tienen de 10,2 a 15 μm . En los hongos que pertenecen al orden *Hyphales* sus conidióforos se forman sobre un estroma micelial en forma de cojín y a la estructura completa se le denomina esporodoquio (Agrios, 2001).

Los dos tipos de conidios son:

- Microconidios: estructuras unicelulares, de forma elipsoidal, y tamaño variable, estando dentro de las medidas de 6-15,8 x 1,9-3,7 μm (Watanabee, 1994).
- Macroconidios: alargados de (20 a 40 μm) y ligeramente curvados, presentan de 3 a 7 septos (variable según especie) que separan células de tamaño o similar. La zona central es algo más gruesa y tiene un diámetro de 4,5 a 6 μm . La célula basal es asimétrica y tiene forma de pie, mientras que la célula apical tiene forma cónica (Alves-Santos, 1999). Nacen generalmente en esporodoquios.



Figura 1: Macro y microconidios de *F. oxysporum* (200x). (Martínez Bermejo, 2008)

F. oxysporum se encuentra ampliamente distribuido, ocupando territorios prácticamente en todo el mundo, debido a ello su variabilidad intraespecífica es enorme (Martín, 2004). Es una especie que se adapta a vivir en cualquier tipo de suelo, y aunque las condiciones óptimas para su actividad son suelos de pH ligeramente ácido, con temperatura de 25-35°C y con humedad moderada, es habitual encontrarnos este hongo en suelos con malas prácticas agrícolas.

Este hongo es un saprófito facultativo y en ausencia del hospedante durante periodos largos puede desarrollarse sobre materia orgánica y en condiciones

adversas, forma estructuras (clamidosporas) que le permiten resistir los periodos de sequedad, frío o falta de alimento (Edel *et al.*, 2001). Esta capacidad hace que pueda cultivarse fácilmente en el laboratorio en medios artificiales donde crece rápidamente (hasta 7 cm en 10 días), formando normalmente un micelio aéreo de aspecto algodonoso con coloraciones blanquecinas que tornan a rosáceas (Figura 2) en medio PDA (Patata dextrosa agar).



Figura 2: Colonia de *F. oxysporum* en medio PDA. (Martínez Bermejo, 2008)

El rango de hospedadores de *Fusarium oxysporum* es muy amplio, desde cultivos agrícolas hasta cultivos forestales (Alves-Santos y Díez, 2011). Sin embargo, se diferencian dentro de las especies lo que se conocen como *formae speciales* (Snyder & Hansen, 1940) que se caracterizan por su especificidad de hospedante, es decir por atacar a una sola especie vegetal o un grupo reducido de especies. En *F. oxysporum* se conocen más de 120 formas especiales y se puede alcanzar un nivel superior de especificidad. Se definen razas fisiológicas dentro de una *forma specialis* por la capacidad de atacar selectivamente a determinadas variedades dentro de una determinada especie cultivada. Los aislados no patogénicos usados en el presente estudio, fueron obtenidos de plantas de judía procedentes de la comarca de El Barco de Ávila.

Su poder patogénico es muy variado, en ciertas zonas muy localizadas sobre determinados cultivos resulta inútil combatirlo convirtiéndole en devastador y en otros casos aparece como simple oportunista sin provocar graves daños. En ciertos lugares se encuentra de forma endémica y la única solución viable es utilizar cultivos no susceptibles al patógeno.

Los efectos que provoca *Fusarium oxysporum* son dos:

- Marchitez general = “Fusarium wilt” (el más grave y específico): Primero se aprecia en las hojas inferiores, observándose un amarillamiento que se desarrolla hasta alcanzar una clorosis masiva. En el interior de la planta el hongo se va desarrollando, obturando los haces vasculares que adquieren tonos marrones. La falta de agua y nutrientes provoca el decaimiento de la planta y la muerte.
- Pudriciones = “root rot” (inespecíficas y normalmente asociado a otros hongos del suelo): Las raíces al principio adquieren una tonalidad ligeramente rojiza que más tarde torna a un color pardo, entonces se extiende hasta cubrir toda la raíz principal, originando fisuras y destrucción de las raíces secundarias. Por lo general la planta retarda su crecimiento y si la afección es grave puede llegar a morir (Agrios, 2001).

El hongo penetra en la planta a través de lesiones en las raíces. Muchas veces esta vía de entrada puede ser provocada por un daño mecánico que en ocasiones es originado por nemátodos (De Vay *et al.*, 1997), debido a esto la fusariosis vascular está asociada o se da con más intensidad si hay ataque de nemátodos que actúan de vector, introduciendo el hongo en la planta.

El poder colonizador de *Fusarium oxysporum* así como su resistencia y permanencia en el suelo convirtieron a aislados no patogénicos como la cepa Fo162 (Diedhiou *et al.*, 2003) y Fo47 (Alves-Santos y Díez, 2011) en organismos muy adecuados para el control biológico. Estos aislados son capaces de provocar resistencia sistémica inducida en las plantas, y posiblemente, debido a la competición, las estirpes no patogénicas reducen la gravedad de la enfermedad causada por las estirpes patogénicas (Alabouvette *et al.*, 2009). La eficacia de este método reside en la similitud entre los aislados patogénicos y los no patogénicos, por tener ambos capacidad de crecimiento y dispersión similares.

2.3. EL CONTROL BIOLÓGICO

Actualmente se admite de forma generalizada la definición de control biológico enunciada por Baker y Cook (1974) hace más de 30 años como “*la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedante o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar*”. Se trata de una definición muy amplia que abarca prácticamente todo tipo de control aparte del químico.

Una definición más concreta dado por los mismos autores, para control biológico es “*la disminución de inóculo o de la gravedad de la enfermedad provocada por un patógeno, mediante la utilización de uno o varios organismos vivos*” (Baker y Cook; 1974).

Los mecanismos mediante los cuales los organismos vivos pueden ejercer un antagonismo frente a hongos patógenos son variados, pudiendo estos actuar individual, simultánea o sinérgicamente. Estos mecanismos, pueden resumirse en antibiosis, protección física, competición, hiperparasitismo y resistencia inducida.

- Por **Antibiosis** se entiende es el antagonismo ejercido por metabolitos antimicrobianos que pueden ser producidos tanto por el antagonista como por la planta hospedante. En general la antibiosis no ha sido explotada con demasiado éxito en el control de hongos patógenos del suelo debido a la falta de conocimientos sobre la aplicación de la fungistasis a las prácticas de cultivo y en algunos casos como *Fusarium*, los patógenos evolucionan superando estos obstáculos químicos (Van Etten *et al.*, 1989)
- La **Protección física**, la originan los hongos ectomicorrícicos (micorrizas), y otros habitantes de la rizosfera, proporcionan protección a las plantas mediante el efecto de una barrera física entre la raíz de la planta y los patógenos como consecuencia de la presencia de un manto fúngico alrededor de las raíces (Marx, 1972, 1973).
- La **Competencia** es otro mecanismo en el que se basa el control biológico. Se define como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo recurso, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los

organismos reduzca la cantidad disponible por los demás (Jarvis, 1998). Un factor esencial para que exista competencia es que haya escasez de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio (Vero y Mondino, 1999).

- **Hiperparasitismo** consiste en el parasitismo de un parásito por otro organismo. La explotación del hiperparasitismo para el control biológico supone la alteración de las condiciones ambientales a favor del hiperparásito o la aplicación de inóculo como pesticida biológico. Por todo ello, es imprescindible conocer tanto la ecología del hiperparásito como la de sus antagonistas presentes de manera natural (Jarvis, 1998). Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, β -1-3-glucanasas y proteasas que lisan o digieren las paredes del hongo (Melgarejo, 1989; Ulhoa 1996).
- La última forma de actuar, es la **Resistencia Inducida** en las plantas mediante aislados no patogénicos o patógenos poco virulentos incluso micorrizas. El método consiste en que plantas que han sido inoculadas previamente con estos microorganismos, desarrollen defensas que frenen un posterior ataque del patógeno (Larkin *et al.*, 1996).

Ninguno de estos mecanismos puede considerarse como una técnica general de protección sino que varios mecanismos actúan simultáneamente en la eliminación de la enfermedad (Alves-Santos y Díez, 2011).

El poder colonizador de *Fusarium oxysporum* así como su resistencia y permanencia en el suelo convirtieron a aislados no patogénicos como la cepa Fo162 (Diedhiou *et al.*, 2003) en organismos muy adecuados para el control biológico. Estos aislados son capaces de provocar resistencia sistémica inducida en las plantas (Hervás *et al.*, 1998; Larkin *et al.*, 1996), y posiblemente, debido a la competición, las estirpes no patogénicas reducen la gravedad de la enfermedad causada por las estirpes patogénicas (Alves-Santos y Díez, 2011). La eficacia de este método reside en la similitud entre los aislados patogénicos y los no patogénicos, por tener ambos capacidad de crecimiento y dispersión similares. Un estudio realizado en soja mostró que más de un 34% de los casi 12000 microorganismos aislados correspondían a *Fusarium* spp. (Baird *et al.*, 1997).

Estudios anteriores han demostrado la utilidad de las bacterias en el control biológico, usándolas solas o con aislados de hongos no patogénicos. Las bacterias además de competir por nutrientes, segregan un compuesto llamado pseudobactina que incrementan la intensidad del antagonismo de los *F. oxysporum* no patogénicos (Lemanceau *et al.*, 1992; Lemanceau *et al.*, 1993, Alabouvette *et al.*, 2009).

Tanto se ha avanzado en el control biológico, que se han seleccionado aislados con un gran potencial, para controlar la marchitez vascular. Este es el caso del aislado Fo47 que actúa por si solo o en combinación con bacterias (Alabouvette *et al.*, 2009). Este aislado, así como otros similares, han sido obtenidos a partir de suelos supresivos. Estos suelos se caracterizan por la capacidad de frenar el ataque de los patógenos y en muchos casos se ha visto su eficiencia en el control de las fusariosis vasculares (Alves-Santos y Díez, 2011).

El futuro el uso de control biológico como parte del Manejo de plagas debe ir en ascenso debido al incremento en el número de plagas resistentes a los insecticidas, contaminación del medio ambiente y el incremento de las regulaciones que prohíben el uso de productos químicos debido a los residuos en los alimentos.

Esto anima a la industria de control biológico para continuar el trabajo con el apoyo de muchos grupos de la sociedad tanto del mundo de los negocios y la empresa, como del mundo académico y de la comunidad científica. El futuro de la gestión de plagas y enfermedades tanto desde un punto de vista agronómico como forestal debería convertirse en un programa integrado, en el que el control biológico tendrá un papel destacado. Este enfoque requiere de la colaboración de muchos investigadores y profesionales así como del apoyo de la sociedad con el fin de lograr la calidad de los productos que los consumidores demandan; la rentabilidad que necesitan los productores agrícolas y forestales; y los agentes de control biológico que reporten beneficios a la industria que los fabrica.

3. OBJETIVOS

El estudio va enfocado a un solo objetivo general que es:

Evaluar e identificar aislados no patogénicos de *Fusarium oxysporum* para el control biológico de hongos oportunistas.

Para conseguir este objetivo vamos a fijarnos los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar el efecto inhibitorio del crecimiento micelial en placa de los aislados no patogénicos frente a los patógenos.
2. Evaluar el efecto inhibitorio de la germinación de esporas del patógeno por los productos excretados por los aislados no patogénicos.
3. Evaluar el efecto sobre la germinación de semillas de judía de la presencia conjunta del patógeno y los no patógenos.
4. Evaluar los aislados no patogénicos frente a patógenos sobre material vegetal (fruta).
5. Identificar los aislados no patogénicos más prometedores como agentes de control biológico.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. OBTENCIÓN DE AISLADOS

En el presente estudio se han utilizado 7 aislados patogénicos obtenidos a partir de diversas muestras vegetales en el laboratorio de Fitopatología de la E.T.S.II.AA. de Palencia (Universidad de Valladolid) y 7 aislados no patogénicos de *Fusarium oxysporum* obtenidos de plantas de judías de la comarca de El Barco de Ávila en el Área de Genética de la Universidad de Salamanca (Alves-Santos *et al.* 1999) (Tabla 1).

Tabla 1: Aislados utilizados en el estudio.

	Aislado	Año	Origen (aislamiento)
Patógenos	<i>Alternaria</i>	2014	E.T.S.II.AA. de Palencia (1)
	<i>Cladosporium</i>	2014	E.T.S.II.AA. de Palencia (1)
	<i>Botrytis</i>	2014	E.T.S.II.AA. de Palencia (1)
	<i>Mucor</i>	2014	E.T.S.II.AA. de Palencia (1)
	<i>Penicillium</i>	2014	E.T.S.II.AA. de Palencia (1)
	<i>Aspergillus flavus</i>	2014	E.T.S.II.AA. de Palencia (1)
	<i>Aspergillus niger</i>	2014	E.T.S.II.AA. de Palencia (1)
	No patógenos	AB82	1995
AB92		1995	El Barco de Ávila (2)
AS3		1993	Solana de Ávila (2)
AB26		1994	El Barco de Ávila (2)
AB63		1995	El Barco de Ávila (2)
AB7		1993	La Carrera (2)
AB62		1995	El Barco de Ávila (2)

(1) Aislado en E.T.S.II.AA. de Palencia. Universidad de Valladolid. (Palencia)

(2) Aislado en Área de Genética de la Universidad de Salamanca (Salamanca)

Todos los aislados usados en el estudio proceden de cultivos monospóricos, por lo que está asegurada la homogeneidad de cada uno de ellos.

4.2. ANÁLISIS DE LA COMPETENCIA DE LOS AISLADOS EN PLACA DE PDA

Este ensayo de control biológico *in vitro* ha sido llevado a cabo para evaluar el antagonismo que ejercen los 7 aislados no patógenos, sobre el crecimiento micelial de los 7 aislados patógenos, mediante su confrontación en placa Petri con medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar Difco). En la preparación de este medio, añadimos 39g de PDA en un litro de agua destilada agitamos hasta disolverlo por completo. Una vez disuelto, se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C. Una vez terminado se distribuye el medio en placas Petri de Ø 90 mm.

Una vez solidificado el medio, en cada placa se colocó en primer lugar, con la ayuda de un bisturí en cabina de flujo laminar (Telstar Mini-V/PCR) un trozo de micelio del aislado patógeno de aproximadamente 5 x 5 mm, extraídos de la periferia de la colonia de partida (en los bordes presenta crecimiento activo mientras que en el centro el micelio es más viejo). Del mismo modo se procedió con el aislado no patógeno de tal forma que quedaron las colonias a unos 5 cm de distancia (Figura 3). En el lugar de contacto del micelio del aislado patógeno con el medio marcamos un punto y hacemos lo mismo con el no patógeno. Con la ayuda de una regla trazamos la recta que une ambos puntos y sobre la cual realizaremos las mediciones del crecimiento de cada uno de los dos aislados en cada uno de los emparejamientos patógeno-no patógeno posibles.

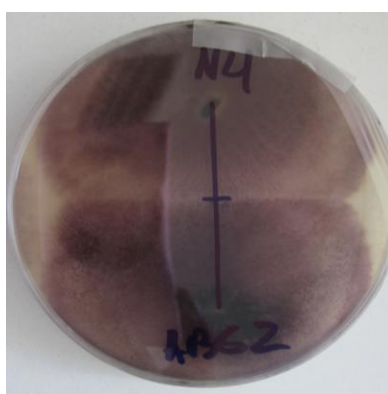


Figura 3: Placa con emparejamiento de patógeno y no patógeno AB62 (Arroyo, 2012).

Después de esto, las placas fueron selladas con parafilm y guardadas en oscuridad en cámara de crecimiento a 23-25°C. Al cabo de 6 días procedemos a la

medición de las placas. De cada emparejamiento posible se hicieron tres repeticiones, de tal forma que el número total de placas eran 147 (Tabla 2).

Tabla 2: Tabla ilustrativa de todos los emparejamientos posibles y sus respectivas repeticiones.

		PATÓGENO						
		<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.flavus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Mucor</i>
NO PATÓGENO	AB7
	AB26
	AB62
	AB63
	AB82
	AB92
	AS3

 Cada casilla muestra un emparejamiento patógeno-no patógeno.

- Cada punto muestra una repetición.

Una vez medido el crecimiento de los aislados (Patógeno-No Patógeno) en cada placa, creamos un índice que emparejará los dos aislados en un sólo factor y simplificará el análisis de los datos. El índice creado es Crecimiento Patógeno/Crecimiento No Patógeno donde relaciona el radio de la colonia en mm de los dos aislados de tal forma que los valores mas bajos indican un menor crecimiento del patógeno.

El análisis estadístico realizado, consistió en un análisis de la varianza de dos factores (variable "índice"; factores: "Patógeno","No patógeno"). Una vez realizada el ANOVA, se procedió a realizar un test LSD, para observar como eran las diferencias.

4.3. EFECTO DE FILTRADOS DE CULTIVOS DE AISLADOS NO PATÓGENOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE AISLADOS PATÓGENOS

El experimento se diseñó para comprobar la capacidad antibiótica de las secreciones producidas por los aislados no patógenos, frente a la esporulación de los aislados patógenos. En este experimento se usaron los 7 aislados no patógenos de *F. oxysporum* y un control que solo contenía el medio.

Para la obtención de las secreciones de los aislados no patógenos, estos se cultivaron en medio líquido PDB. El medio PDB (22 g de Potato Destroxe Broth en 1 L de

agua destilada), se agitó hasta conseguir la homogenización, se esterilizó y se vertieron 40 ml en matraces Erlenmeyer estériles de 100 ml de capacidad, con esto se consiguió que hubiera suficiente oxigenación en el matraz para que se desarrolle el hongo. Posteriormente depositamos en los matraces, ayudados de un bisturí y en la cabina de flujo laminar, un trozo de 5x5 mm de superficie del margen de una colonia que crecía activamente para garantizar su posterior crecimiento (todo el proceso se realizó en la cabina de flujo laminar). Este proceso se llevó a cabo con todos los aislados que queríamos probar, los 7 aislados no patogénicos de *F. oxysporum* y el control, estos matraces fueron etiquetados y colocados en un agitador orbital a 140 r.p.m. en condiciones de oscuridad, a 20°C, durante seis días.

Una vez incubados los cultivos, se recogieron las secreciones mediante filtración a través de tres capas de papel de filtro, que impedía el paso del micelio y de las esporas quedando solamente el medio y los posibles productos excretados por los no patógenos (Figura 4).

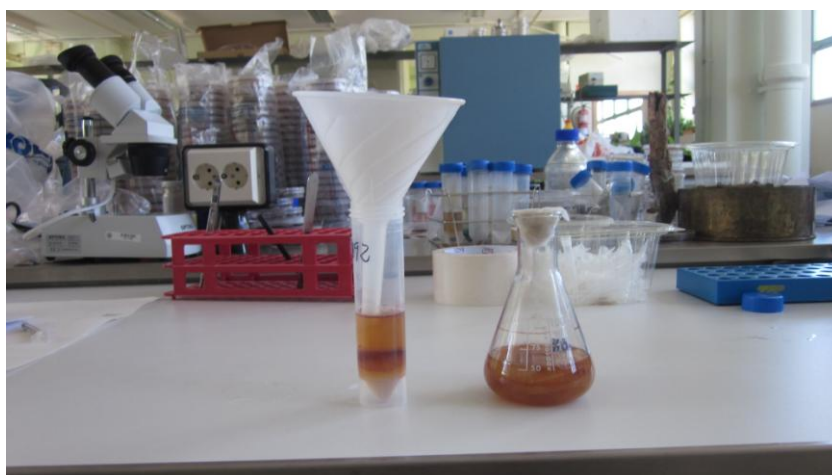


Figura 4: Recolección de de las secreciones producidas por el aislado no patógeno (en la foto el AB92).

Una vez obtenidos los filtrados de los aislados no patogénicos para cada filtrado vertimos 0,5 ml, en tubos eppendorf y añadimos 0,5 ml de una suspensión de conidios de cada uno de los siete aislados patógenos con los que trabajamos en el estudio (Figura 5-Tabla 3). Las suspensiones de esporas fueron obtenidas a partir de placas con aislados patógenos, estas esporas se recogieron en una solución acuosa. Todo ello se incubó en una cámara de cultivo a 25°C y en condiciones de oscuridad, durante toda la noche.

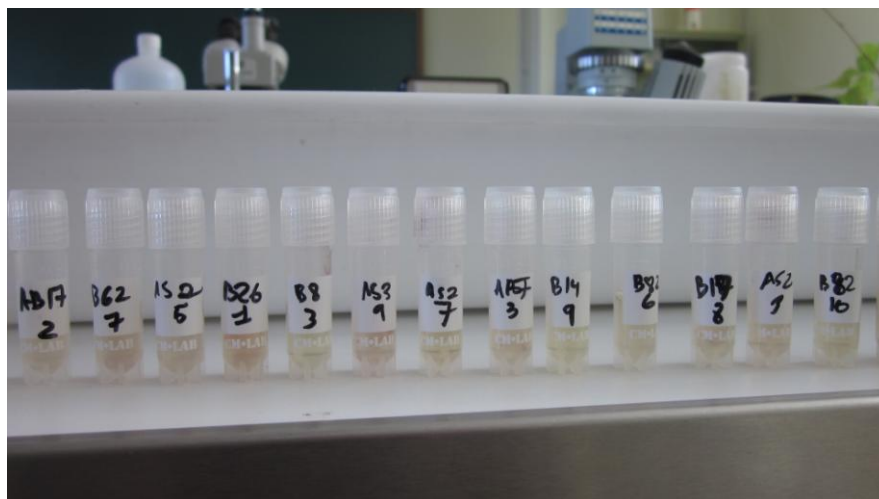


Figura 5: Tubos eppendorf con la mezcla del filtrado no patógeno-esporas patógeno (Arroyo, 2012).

Tabla 3: Tabla ilustrativa del total de tubos eppendorf con la mezcla del filtrado no patógeno-esporas patógeno.

		PATÓGENO						
		<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>A niger</i>	<i>A flavus</i>	<i>Botritis</i>	<i>Mucor</i>
NO PATÓGENO	AB7	X	X	X	X	X	X	X
	AB26	X	X	X	X	X	X	X
	AB62	X	X	X	X	X	X	X
	AB63	X	X	X	X	X	X	X
	AB82	X	X	X	X	X	X	X
	AB92	X	X	X	X	X	X	X
	AS3	X	X	X	X	X	X	X
	SIN NP	X	X	X	X	X	X	X

X

 Cada casilla muestra un emparejamiento del que se tomaron dos muestras.

El número total de tubos eppendorf con los que trabajamos fueron 56. A las 12 horas tomamos dos muestras de cada tubo, se cuantificaron las esporas mediante un microscopio óptico, y calculamos la media de esporas germinadas como porcentaje. Con estos datos se llevó acabo el análisis estadístico mediante un análisis de la varianza de dos factores (variable “porcentaje de germinación”, factores: “Patógeno”, “No patógeno”). Una vez realizada el ANOVA, se procedió a realizar un test LSD.

4.4. EFECTO SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE JUDÍA DE LA PRESENCIA CONJUNTA DEL PATÓGENO Y LOS NO PATÓGENOS

Este experimento se diseñó para comprobar si existe un efecto inhibitorio en la germinación de semillas de planta de judía (*Phaseolus vulgaris* L. variedad Blanca de Riñón/Riojana), cuando éstas se cultivan en presencia de patógeno y no patógeno.

En éste ensayo no existe un sustrato. Sobre la placa Petri (en este caso de vidrio Ø 110 mm) depositamos un disco de papel de filtro y sobre éste colocamos 5 semillas de judía previamente esterilizadas mediante inmersión en lejía durante cinco minutos. Una vez colocadas las semillas (e inoculadas), ponemos otro disco de papel cubriendo a éstas y procedemos al riego mediante fumigación.

Para la obtención de esporas de aislados patógenos y aislados no patógenos, igual que en los casos anteriores disponemos placas con dichos aislados, estas son rellenadas con agua destilada estéril para formar la suspensión acuosa que recogemos con una pipeta. Procedemos al conteo de esporas de cada aislado mediante cámara Thoma.

En cada placa Petri (Figura 6), echamos sobre las 5 semillas un millón de esporas del patógeno y otro tanto del no patógeno (en los controles se aplica un volumen equivalente de agua estéril).



Figura 6: Placa con las cinco semillas de judía.

El número total de placas fue de 64: 49 placas de combinaciones de patógeno-no patógeno con semillas, 7 placas de esporas de patógenos con semillas, 7 placas de esporas de no patógeno con semillas y una placa de control (Tabla 4).

Tabla 4: Tabla ilustrativa del total de placas formadas por las combinaciones de semillas con los aislados patogénicos y no patogénicos.

		PATÓGENO							
		SIN P	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.flavus</i>	<i>Botritis</i>	<i>Mucor</i>
NO PATÓGENO	AB7	X	X	X	X	X	X	X	X
	AB26	X	X	X	X	X	X	X	X
	AB62	X	X	X	X	X	X	X	X
	AB63	X	X	X	X	X	X	X	X
	AB82	X	X	X	X	X	X	X	X
	AB92	X	X	X	X	X	X	X	X
	AS3	X	X	X	X	X	X	X	X
	SIN NP	X	X	X	X	X	X	X	X

Al cabo de dos semanas se hizo el recuento de semillas germinadas de cada una de las combinaciones realizadas y dentro de las semillas que presentaban germinación se discriminó entre las que podían ser viables o no viables (presencia de descomposición). Con estos datos se llevó a cabo el análisis estadístico ANOVA de dos factores (variable "porcentaje de germinación", factores: "Patógeno", "No patógeno") y el análisis estadístico ANOVA de dos factores (variable "viabilidad semillas", factores: "Patógeno", "No patógeno"). En el caso de la variable "viabilidad semillas" se hizo un test LSD.

4.5. ENSAYOS *IN VIVO* SOBRE MATERIAL VEGETAL (NARANJAS)

El objetivo de este ensayo, es comprobar si los aislados no patogénicos empleados en este estudio, tienen posibilidades en el control biológico de tres hongos oportunistas (*Alternaria*, *Botrytis* y *Penicillium*) sobre material recolectado (fruta) en este caso naranjas.

Los ensayos que realizaremos se basan en la inoculación simultánea de aislados no patogénicos más aislados patogénicos (Coinoculación), en cada una de las naranjas.

Los aislados patógenos con los que trabajamos en este ensayo fueron 3, *Alternaria*, *Botrytis* y *Penicillium*, que son frecuentes oportunistas sobre frutas y verdura almacenadas (especialmente *Penicillium* sobre cítricos). Fueron enfrentados a los 7 aislados no patógenos que hemos empleado en los ensayos anteriores y un fungicida comercial.

Las naranjas se lavaron y se introdujeron en bandejas de plástico (separando mediante barreras de papel/plástico las distintas combinaciones) y se infectaron dentro del laboratorio de Fitopatología de la E.T.S.I.I.A.A. de Palencia, a temperatura ambiente. El número total de naranjas con las que trabajamos es de 90 de las cuales 63 en combinaciones de patógeno-no patógeno en naranjas, 9 de combinaciones de esporas patógeno-fungicida en naranjas, 9 de esporas de patógeno en naranjas (Control +) y 9 naranjas de control (no llevan esporas de ningún tipo, control 0). (Tabla 5)

Tabla 5: Tabla ilustrativa del total de naranjas empleadas en éste ensayo.

		PATÓGENOS		
		<i>Alternaria</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Penicillium</i>
NO PATÓGENOS	AB82
	AB26
	AB63
	AB7
	AS3
	AB92
	AB62
	Fungicida
	Control +
	Control 0

4.5.1. ENSAYO DE COINOCULACIÓN CON LOS AISLADOS PATÓGENOS Y LOS AISLADOS NO PATÓGENOS

Para la coinoculación, procedimos a la recogida de esporas de los aislados patogénicos y de los aislados no patogénicos a partir de cultivo en placa Petri con medio PDA. La recolección se realiza mediante arrastre con agua destilada estéril y las muestras son recogidas en tubos Falcón de 50 ml (Figura 7).

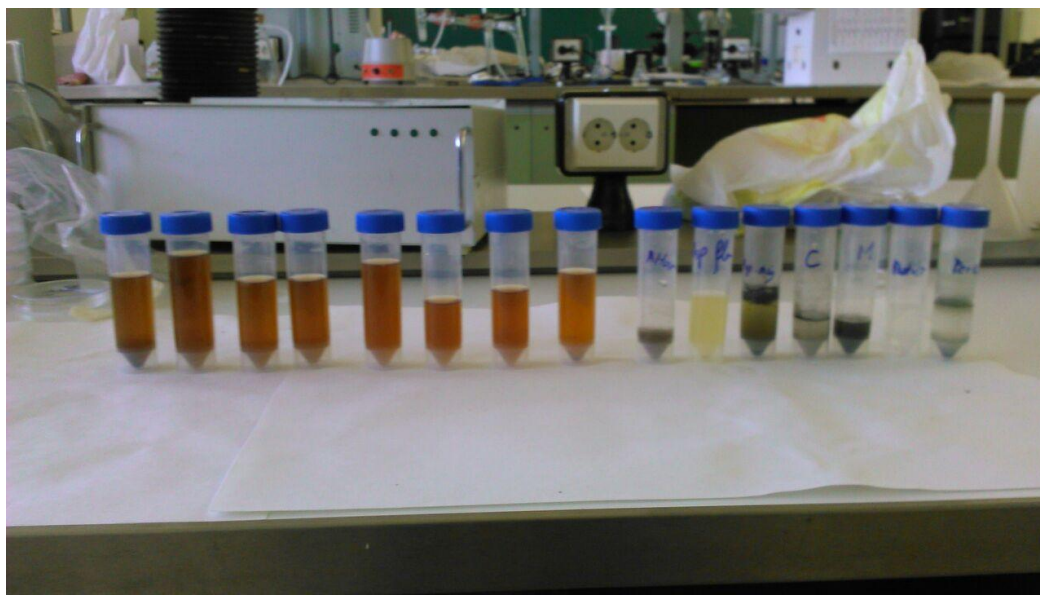


Figura 7: Tubos con la suspensión esporal

Una vez tenemos la suspensión de esporas, procedemos al conteo de esporas de cada aislado mediante cámara Thoma. Hecho el recuento de esporas, procedimos a la infección de las naranjas. Para ello con la ayuda de micropipetas depositamos en la superficie de cada naranja un millón de esporas correspondientes a patógenos y no patógenos según la combinación que llevara dicha naranja (Figura 8).



Figura 8: Total de combinaciones en ensayo de coinoculación de naranjas.

Al cabo de dos semanas tras la siembra superficial de las naranjas y visto que no presentaban ningún tipo de daño, procedimos a hacer un corte superficial a cada naranja y las volvimos a infectar con un millón de esporas correspondientes a patógenos y no patógenos según la combinación que llevara dicha naranja.

Una vez coinoculadas las naranjas, tomamos datos de medición del daño a los 10 días y a los 30 días.

4.5.2. VALORACIÓN DE LOS DAÑOS EN NARANJA

Para efectuar una valoración del daño de cada combinación, medimos con una regla el diámetro de micelio o de mancha que presentaba cada combinación de naranjas.

Una vez tomados los datos a los 10 días y a los 30 días, se procedió a realizar el análisis estadístico, en el cual no tendremos en cuenta las combinaciones de los patógenos con el fungicida y los controles (naranjas sin ningún tipo de espora). El análisis estadístico realizado, consiste en un análisis estadístico ANOVA de dos factores (variable "Lesión 10 días", factores: "Patógeno", "No patógeno") y el correspondiente test LSD para comprobar las diferencias. Del mismo modo hicimos un

análisis estadístico ANOVA de dos factores (variable “Lesión 30 días”, factores: “Patógeno”, “No patógeno”) y el correspondiente test LSD para comprobar las diferencias.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de la varianza (ANOVA) y posteriores análisis estadísticos (LSD) se realizaron con el software STATGRAPHICS Centurión XVI Versión 16.1.17 (32-bits). La descriptiva y graficas fueron construidas con el software habitual de Microsoft.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ANÁLISIS DE LA COMPETENCIA DE LOS AISLADOS EN PLACA DE PDA

Se comprobó la competencia ejercida por los siete aislados saprófitos de *Fusarium oxysporum* (AB82, AB26, AB63, AB7, AS3, AB92 y AB62) sobre los siete aislados patógenos (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Botrytis*, *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*), realizando tres repeticiones de cada combinación tal y como se describe en el apartado 4.2 de Material y Métodos.

La variable con la que vamos a trabajar es la variable “índice”, (Crecimiento Patógeno/Crecimiento No Patógeno), este índice facilita el trabajo ya que convertimos dos variables en una sola. Este índice muestra la diferencia de crecimiento entre el saprófito y el patógeno. Nos interesa que el crecimiento del no patógeno sea superior al crecimiento del patógeno, es decir, que la variable “índice” sea lo más baja posible.

Se realizaron las mediciones a los 6 días de sembrar las placas, con estos datos llevamos a cabo el análisis estadístico. Los datos que aparecen en la Tabla 6 corresponden a medias.

Tabla 6: Test LSD en los Valores del índice “Crecimiento Patógeno/Crecimiento No Patógeno”.

		PATÓGENO							MEDIA	LSD
		<i>Botrytis</i>	<i>Alternaria</i>	<i>A.flavus</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Mucor</i>	<i>A.niger</i>	<i>Penicillium</i>		
NO PATÓGENO	AS3	0,41	0,91	1,66	0,87	2,16	3,57	3,38	1,85	a
	AB63	0,34	0,79	1,64	1,82	1,71	3,86	4,3	2,06	ab
	AB82	0,46	0,74	1,82	0,83	1,73	3,86	6,15	2,23	ab
	AB92	0,37	0,91	0,95	2,54	2,42	5,52	3,52	2,32	ab
	AB26	0,48	1,1	0,96	3,59	3,13	2,96	4,26	2,35	ab
	AB62	0,38	0,79	0,71	3,03	1,98	4,54	5,56	2,43	b
	AB7	0,5	0,86	0,86	2,28	2,41	5,42	5,5	2,55	b
	MEDIA	0,42	0,87	1,23	2,14	2,22	4,25	4,67	2,26	
LSD	A	AB	B	C	C	D	D			

(1) Las Medias con diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre aislados no patógenos (Test LSD, P=0,05)

(2) Las Medias con diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas entre aislados patógenos (Test LSD, P=0,05)

El análisis estadístico realizado, consiste en un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores: Patógeno (pato) y no patógeno (NOPA) (Tabla 7) para la

variable “índice”. Con ello pretendemos saber si las diferencias entre patógenos y entre no patógenos son significativas

Tabla 7: Análisis de Varianza para enfrentamientos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:PATO	338,614	6	56,4357	65,83	0,0000
B:NOPA	6,88327	6	1,14721	1,34	0,2477
INTERACCIONES					
AB	56,3159	36	1,56433	1,82	0,0107
RESIDUOS	83,1583	97	0,857302		
TOTAL (CORREGIDO)	485,233	145			

El valor de la probabilidad para los dos factores nos indica que no hay diferencias significativas entre aislados no patógenos (resultando un p-valor de 0,2477), y que hay diferencias altamente significativas entre patógenos (resultando un p-valor de 0,0000). Una vez realizado el ANOVA, se procedió a realizar un test LSD, para observar cómo eran las diferencias (muestra los distintos grupos homogéneos) (Tabla 6).

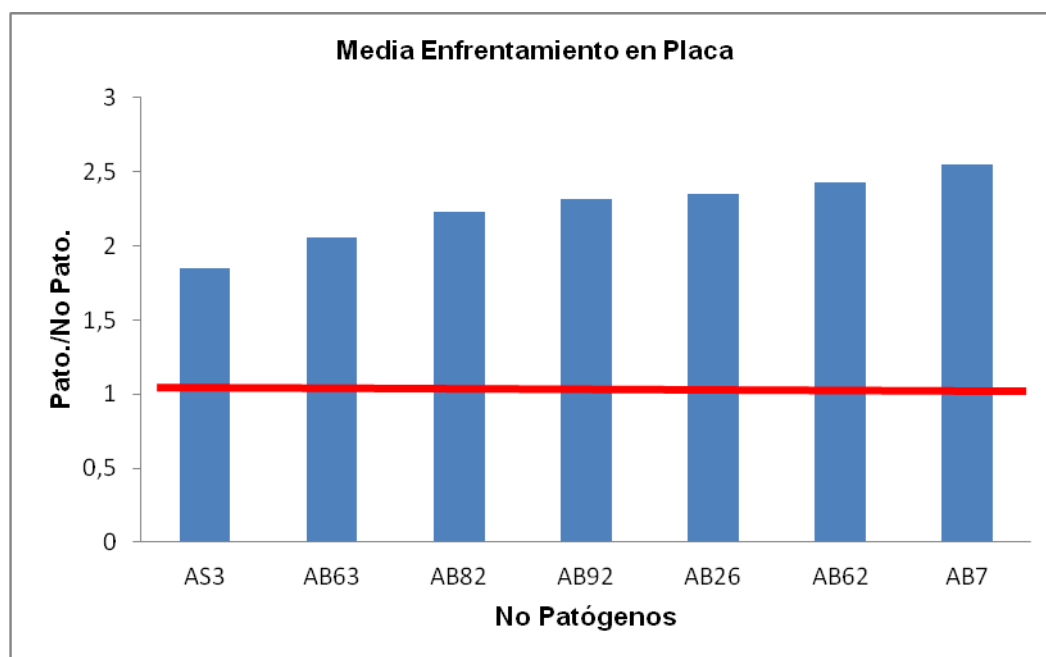


Figura 9: Valores medios de los aislados no patógenos en el índice Patógeno/No patógeno.

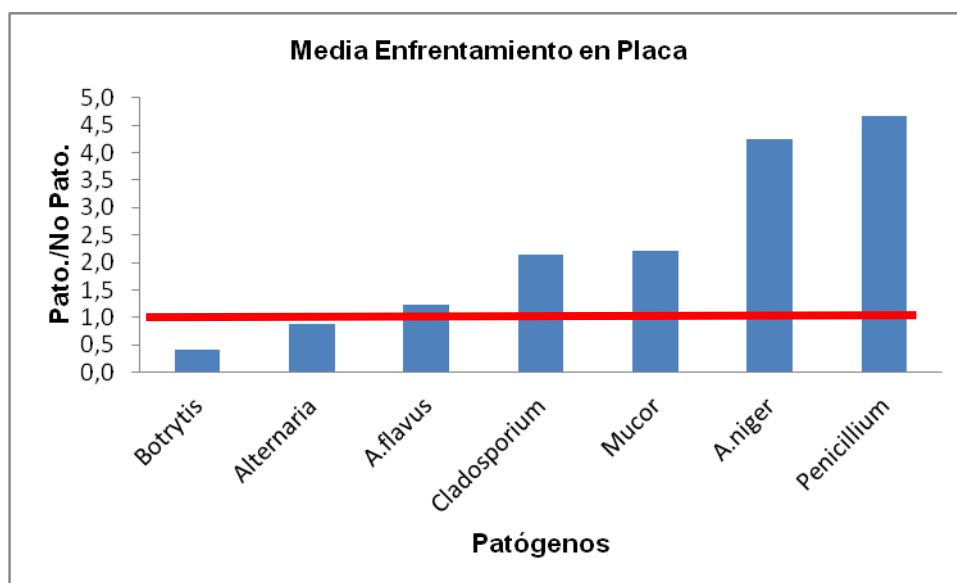


Figura 10: Valores medios de los aislados patógenos en el índice Patógeno/No patógeno.

En el análisis LSD realizado (tabla 6), se observa, que no hay diferencias estadísticamente significativas entre aislados no patógenos cuyo comportamiento es aparentemente similar entre todos ellos (Figura 9).

Sin embargo el efecto de variación entre patógenos si es significativo y los valores medios para las placas con *Botrytis* indican un crecimiento superior de los no patógenos (Figura 10) aunque estos resultados pueden deberse a un desarrollo micelial más lento en esta especie en relación con *Mucor*, *Aspergillus niger* o *Penicillium*.

Existe además interacción significativa lo cual indica diferencia en casos concretos y es el resultado de resultados que se cruzan. Sirva de ejemplo el aislado AB82 que da buen resultado con *Cladosporium* (0,83 frente a 2,14 de media) pero malo con *Penicillium* (6,15 frente a 4,67 de media). Esta interacción puede ser interesante pero poco práctica a la hora de seleccionar un aislado que sea eficiente como agente de control biológico de amplio espectro.

En estudios similares realizados previamente, como el trabajo sobre plantas de tabaco (Arroyo, 2012) y de judía (Martínez Bermejo, 2008), los resultados del índice "Crecimiento Patógeno/Crecimiento No Patógeno" son muy distintos a los de nuestro presente estudio. En estos ensayos in vitro frente a *F. oxysporum* patógenos de tabaco, si se destacaron algunos no patógenos como AB62, AS3 y el AB92 y frente a patógenos de judía destacaron AB92, AS3 y el AB7. Sin embargo hay que tener en

cuenta que en estos estudios todos los aislados son de *Fusarium oxysporum* tanto patógenos como no patógenos y el tipo de enfermedad es una fusariosis vascular que es muy diferente a los patógenos oportunistas del presente estudio.

Otros estudios de competencia sobre patógenos de postcosecha como *Penicillium digitatum*, el agente causal del moho verde en cítricos, emplearon varias cepas bacterianas de *Pseudomonas* spp. y aislados fúngicos de *Trichoderma* spp. (Panebianco *et al.*, 2015). Estas cepas bacterianas y fúngicas inhibieron fuertemente el crecimiento de patógenos *in vitro* en medio PDA y en un medio a base de cítricos.

5.2. EFECTO DE FILTRADOS DE CULTIVOS DE AISLADOS NO PATÓGENOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE AISLADOS PATÓGENOS

En este estudio hemos analizado el potencial efecto antibiótico de los filtrados de los aislados saprófitos, sobre la germinación de esporas de aislados patógenos. En este experimento usamos los siete aislados no patógenos de *F. oxysporum*, los siete aislados patógenos y un control (solo lleva medio no inoculado), que nos sirve de testigo. Para la obtención de las secreciones de los aislados no patógenos, estos se cultivaron en medio líquido PDB.

Se comprobó la capacidad antibiótica ejercida por los siete saprofitos mencionados anteriormente, sobre los aislados patógenos. Para ello usamos la variable "Porcentaje de Germinación", esta representa el porcentaje de esporas germinadas de patógeno tras una noche en medio líquido con las secreciones de los no patógenos. Nos interesa que el porcentaje de germinación de esporas de aislados patógenos sea lo más bajo posible.

Se realizó la medición aproximadamente a las 12 horas, por ser el momento óptimo para valorar la germinación de *F. oxysporum*. Los datos que aparecen en la Tabla 8 son medias, dado que se realizaron 2 mediciones de cada emparejamiento.

Tabla 8: Test LSD en los valores de la variable “porcentaje de germinación” SIN NP= sin no patógeno.

		PATÓGENO							MEDIA
		<i>Botrytis</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.flavus</i>	<i>Mucor</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	
NO PATÓGENO	AB26	0	0	0	0	0,3	0,6	6,7	1,1
	AB7	0	0	0,7	0,2	2,5	2,3	8,5	2,0
	AB92	0	0	0	0,2	1,6	1,5	11,1	2,1
	AB82	0	0	0	0,2	2,0	1,5	12,5	2,3
	AS3	0	0,3	1,0	1,2	3,9	2,7	7,2	2,3
	SIN NP	0	1,3	0,3	2,1	2,5	6,9	8,1	3,0
	AB63	0	0,3	1,3	0	2,0	7,0	18,9	4,2
	AB62	0	0	0	0,8	5,0	5,0	18,7	4,2
	MEDIA	0	0,2	0,4	0,6	2,5	3,4	11,5	2,7
LSD	A	A	AB	AB	BC	C	D		

(1) Las las medias con diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre aislados no patógenos (Test LSD, P=0,05)

(2) Las Medias con diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas entre aislados patógenos (Test LSD, P=0,05)

(3) SIN NP= sin no patógeno.

El aislado de *F. oxysporum* que más inhibió la germinación fue AB26, reduciendo la germinación a un 1,1% el siguiente aislado que más inhibió la germinación fue AB7, reduciendo la germinación a un 2%.

El análisis estadístico realizado, consiste en un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores: patógeno y no patógeno (Tabla 9) siendo la variable “porcentaje de germinación”. Una vez realizada el ANOVA, se procedió a realizar un test LSD, para observar cómo eran las diferencias (Tabla 8).

Tabla 9: Análisis de Varianza para Germinación de Esporas.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:NOP	59,0613	7	8,43732	2,00	0,0773
B:PATO	803,307	6	133,884	31,80	0,0000
RESIDUOS	176,827	42	4,21018		
TOTAL (CORREGIDO)	1039,2	55			

Estadísticamente puede decirse que no hay diferencias significativas entre aislados no patógenos (resultando un p-valor de 0,0773), y que hay diferencias altamente significativas entre patógenos (resultando un p-valor de 0,0000).

En la Figura 11 se puede apreciar visualmente que el aislado AB26 obtuvo el valor más bajo de la variable “porcentaje de germinación”. Sin embargo los valores extremadamente bajos de germinación (Figura 12) hacen que las diferencias no sean significativas, quizás porque el método esta optimizado para la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* y puede que estas especies necesiten periodos más largos de incubación.

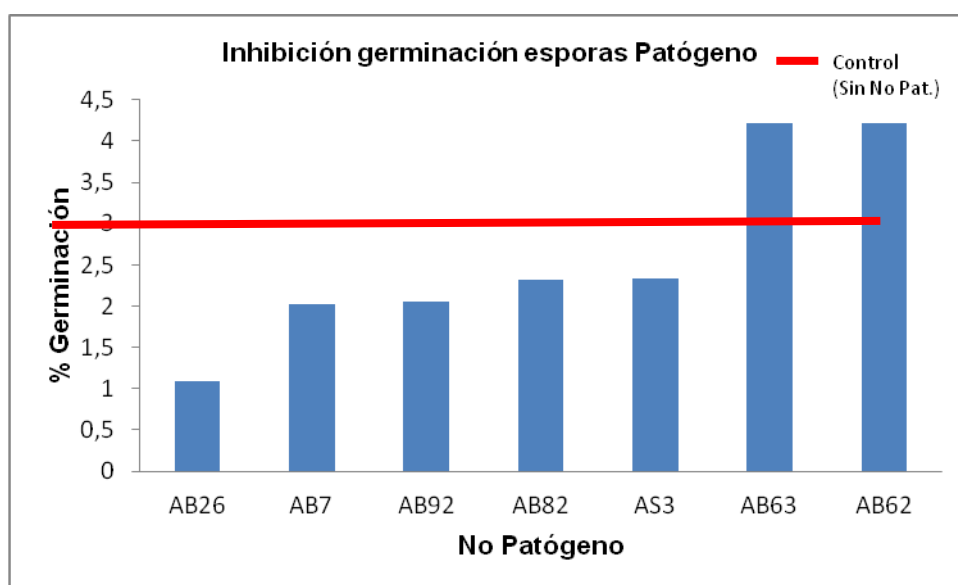


Figura 11: Valores medios de los aislados no patógenos en la variable “porcentaje de germinación” de esporas.

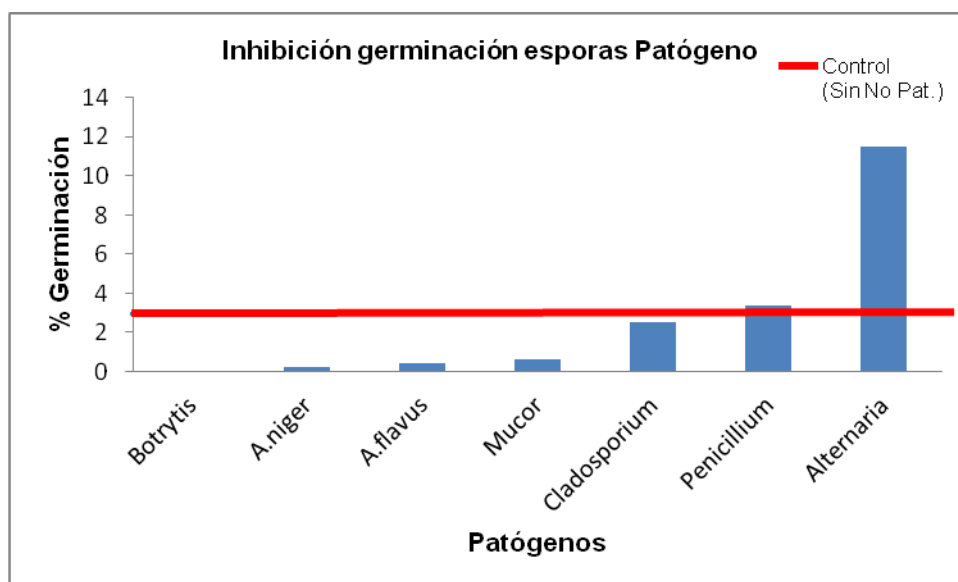


Figura 12: Valores medios de los aislados patógenos en la variable “porcentaje de germinación” de esporas.

En el análisis estadístico el factor patógeno si es significativo pero ha de tomarse con mucha cautela pues muchos de los resultados son cero (no hay germinación) incluso en los controles. Además se da la circunstancia de que algunos no patógenos no sólo no inhiben la germinación sino que la estimulan. Por ello desde un punto de vista práctico no se ven resultados beneficiosos en este ensayo.

En un estudio previo con estos aislados no patógenos en judía (Martínez Bermejo, 2008), los valores medios de la variable “porcentaje de germinación”, son variables respecto a los de nuestro presente estudio. En este ensayo resultaron como mejores aislados para la posible inhibición de la germinación de esporas el AB26, AB62 y el AS3, presentado diferencias significativas entre aislados no patogénicos. En nuestro ensayo sobre esporas de diferentes aislados patogénicos, coincide la eficiencia del aislado AB26 que es el que mejor se comporta rebajando en todos los caso la germinación de los controles, sin embargo no hay diferencia estadísticamente significativas entre aislados no patogénicos.

En otros trabajos anteriores (Mandeel, 2006; Mandeel, 2007), los resultados obtenidos con este ensayo parecen ser esperanzadores en control biológico contra *F.oxysporum* sin embargo, se observa como necesario hacer más trabajos, especialmente ensayos *in vivo*. Se han demostrado diferencias existentes en el comportamiento de estos agentes de control biológico cuando se utilizan en medio artificial en lugar de usarse sobre planta en condiciones más próximas a las de campo (Green, 1997).

5.3. EFECTO SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE JUDÍA DE LA PRESENCIA CONJUNTA DEL PATÓGENO Y LOS NO PATÓGENOS

En este estudio hemos analizado el efecto del cultivo de esporas de patógeno y no patógeno, sobre la germinación de semillas de planta de judía. En este experimento usamos los siete aislados no patógenos de *F. oxysporum*, los siete aislados patógenos de *F.oxysporum* y un control (solo llevará semillas de planta de judía), que nos servirá de testigo.

Se comprobó la capacidad inhibitoria de la germinación ejercida por la presencia conjunta de los siete aislados no patógenos y los siete aislados patógenos en las distintas combinaciones posibles. La variable con la que vamos a trabajar es el

“germinación semillas”, esta representa la cantidad de semillas germinadas, en presencia de la suspensión de esporas de patógeno y no patógeno. Nos interesa que el porcentaje de germinación de semillas de planta de judía sea lo más alto posible. Se realizó la medición a las dos semanas, por ser el momento en el que se pudo apreciar con buena visibilidad la germinación de semillas de planta de judía. Los valores que aparecen en la Tabla 10 son datos que reflejan una única medición.

Tabla 10: Valores de la variable “germinación semillas”.

		NO PATÓGENO																MEDIA G
		AB82		AB7		AB63		AS3		AB62		SIN NP		AB92		AB26		
		G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	
PATÓGENO	<i>Mucor</i>	5	0	2	3	1	4	2	3	5	0	5	0	5	0	5	0	3,75
	<i>Botrytis</i>	1	4	5	0	3	2	5	0	5	0	1	4	5	0	5	0	3,75
	<i>A.flavus</i>	0	5	1	4	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	3,875
	<i>A.niger</i>	3	2	5	0	5	0	3	2	5	0	5	0	2	3	5	0	4,125
	<i>Alternaria</i>	4	1	5	0	5	0	5	0	0	5	5	0	5	0	5	0	4,25
	<i>Cladosporium</i>	5	0	4	1	3	2	5	0	5	0	5	0	5	0	3	2	4,375
	SIN P	5	0	5	0	5	0	3	2	5	0	5	0	5	0	5	0	4,75
	<i>Penicillium</i>	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
	MEDIA G	3,5		4		4		4,125		4,375		4,5		4,625		4,75		

(1) G=Germinada; NG=No germinada; SIN NP= sin no patógeno; SIN P = sin patógeno.

Los aislados de *F. oxysporum* que aparentemente frenaron más la inhibición de germinación de semillas de los aislados patogénicos fueron el AB26, presentando el mayor porcentaje de germinación con un 95% (4,75/5), el siguiente aislado fue el AB92, con un porcentaje del 92,6% (4,62/5) si bien las diferencias no son estadísticamente significativas. Hay que señalar que en los controles sin no patógeno la germinación es completa con la excepción de *Botrytis* que afecto severamente a la germinación.

El análisis estadístico realizado, consiste en un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores con la variable “germinación semillas” (Tabla 11).

Tabla 11: Análisis de Varianza para germinación de semillas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:NOP	9,35938	7	1,33705	0,61	0,7487
B:PATO	11,8594	7	1,6942	0,77	0,6177
RESIDUOS	108,266	49	2,2095		
TOTAL (CORREGIDO)	129,484	63			

No hay diferencias estadísticas significativas tanto entre aislados no patógenos (p-valor de 0,7487) como entre patógenos (resultando un p-valor de 0,6177).

En vista a la ausencia de diferencias en germinación y observando el estado de las semillas se consideró oportuno valorar visualmente la viabilidad de las semillas ya que algunas a pesar de estar germinadas presentaban un aspecto que indicaba que no saldrían adelante. Se procedió a realizar esta segunda medición estudiando la viabilidad de las semillas germinadas. Los valores que aparecen en la Tabla 12 son datos que reflejan una única medición.

Tabla 12: Valores de la variable “viabilidad semillas”.

		NO PATÓGENO																MEDIA V	LSD
		AS3		AB82		AB92		AB7		AB63		AB26		AB62		SIN NP			
		V	NV	V	NV	V	NV	V	NV	V	NV	V	NV	V	NV	V	NV		
PATÓGENO	<i>Alternaria</i>	1	4	0	4	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0,125	a
	<i>Mucor</i>	0	2	0	5	0	5	0	2	0	1	0	5	0	5	3	2	0,375	ab
	<i>Botrytis</i>	0	5	0	1	0	5	0	5	1	2	0	5	2	3	1	0	0,5	ab
	<i>A.flavus</i>	0	5	0	5	0	5	0	1	0	5	0	5	0	5	5	0	0,625	ab
	<i>Cladosporium</i>	0	5	1	4	0	5	2	2	0	3	1	2	2	3	0	5	0,75	ab
	<i>SIN P</i>	0	3	0	5	0	5	0	5	0	5	2	3	2	3	5	0	1,125	ab
	<i>A.niger</i>	0	3	0	3	0	2	0	5	5	0	5	0	5	0	0	5	1,875	bc
	<i>Penicillium</i>	0	5	0	5	3	2	1	4	4	1	5	0	5	0	5	0	2,875	c
MEDIA V		0,125		0,125		0,375		0,375		1,25		1,625		2		2,375			
LSD		A		A		AB		AB		ABC		BC		C		C			

(1) Las medias con diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre aislados patógenos (Test LSD, P=0,05)

(2) Las Medias con diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas entre aislados no patógenos (Test LSD, P=0,05)

(1) V=Viable; NV=No viable; SIN NP= sin no patógeno; SIN P = sin patógeno.

Los aislados no patogénicos de *F. oxysporum* que en su mezcla con los patógenos dan una mayor viabilidad de las semillas germinadas fueron el AB62, presentando el mayor número de semillas viables con una media de 2, el siguiente aislado fue el AB26, con número de semillas viables con una media de 1,63. Hay que señalar que las placas que únicamente llevan las esporas de los patógenos presentan una viabilidad mayor y presentan una media de 2,38. Por tanto el efecto de los no patógenos agrava la situación de las semillas. Por otro lado en la tabla se observa que la mejor media de semillas viables se da en las combinaciones con *Penicillium*.

El análisis estadístico realizado, consiste en un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores con la variable “viabilidad semillas” (Tabla 13).

Tabla 13: Análisis de Varianza para viabilidad semillas.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:NOP	45,1875	7	6,45536	3,18	0,0075
B:PATO	47,1875	7	6,74107	3,32	0,0057
RESIDUOS	99,5625	49	2,03189		
TOTAL (CORREGIDO)	191,938	63			

Estadísticamente puede decirse que hay diferencias altamente significativas tanto entre aislados no patógenos (resultando un p-valor de 0,0075), como entre patógenos (resultando un p-valor de 0,0057). Una vez realizada el ANOVA, se procedió a realizar un test LSD, para observar cómo eran las diferencias (Tabla 12).

En la Figura 13 se puede apreciar visualmente que las mejores combinaciones en placa, y por tanto que presentaban el valor más alto de la variable “viabilidad semillas germinadas”, fueron las que únicamente presentaban esporas de patógeno por tanto las diferencias entre aislados no patógenos no son útiles desde el punto de vista del control ya que estas diferencias reflejan distintos niveles de agravar los daños.

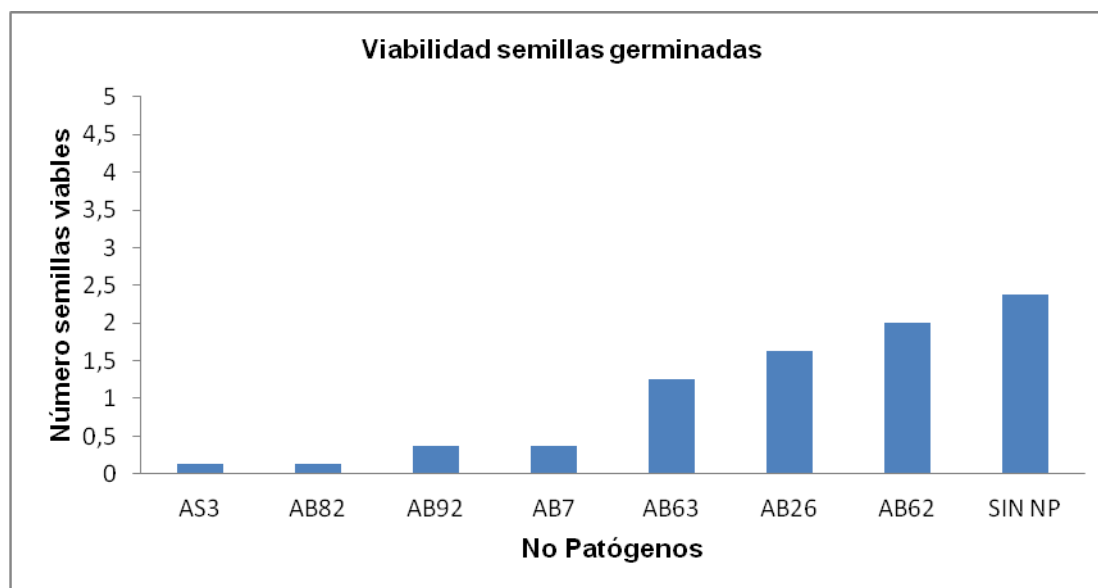


Figura 13: Valores medios de los aislados no patógenos en la variable “viabilidad de semillas” germinadas.

En la Figura 14 podemos observar que el valor más alto de la variable “viabilidad semillas germinadas” se da en la combinación de *Penicillium* con cada uno de los aislados no patógenos de *F.oxysporum*. Por otro lado los valores más bajos se dan con *Alternaria* con una viabilidad casi nula (sólo una semilla viable en todo el ensayo).

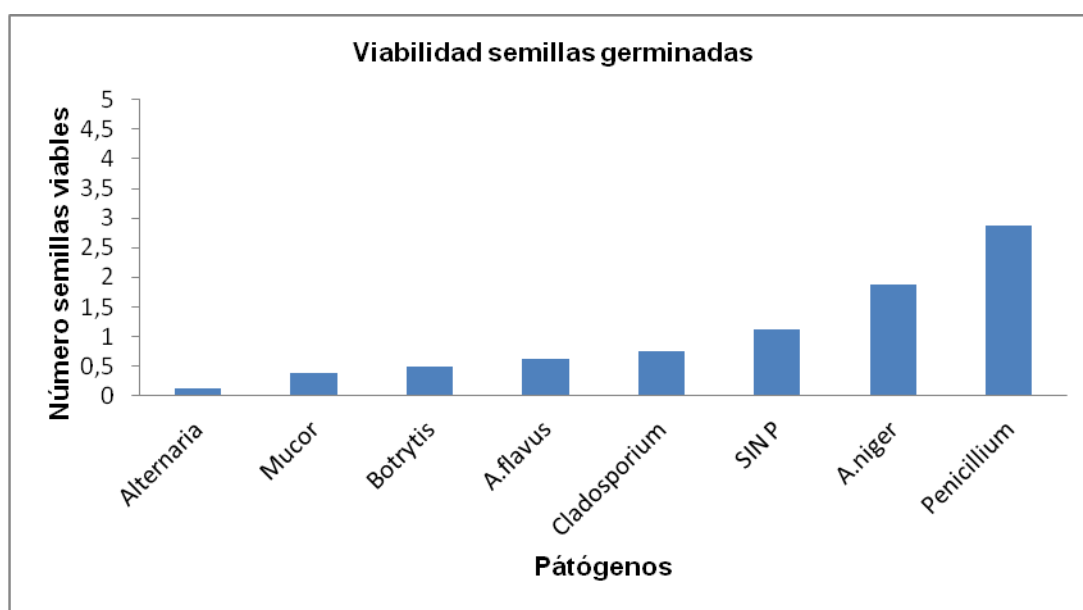


Figura 14: Valores medios de los aislados patógenos en la variable “viabilidad de semillas” germinadas

Hay que señalar que para algunas especies la viabilidad es mayor que el control (sin patógeno) como el caso de *Penicillium*, y es peculiar en el caso de las dos especies de *Aspergillus* donde *A. flavus* reduce la viabilidad y *A. niger* la estimula.

A pesar de los resultados estadísticamente significativos nos ocurre como en los ensayos anteriores que no resulta útil en el control biológico en este caso por que los valores con los candidatos a agente de control producen mas daño que beneficio.

5.4. ENSAYOS *IN VIVO* SOBRE MATERIAL VEGETAL (NARANJAS)

Los aislados que usamos en este estudio, son los siete aislados de *F. oxysporum* utilizados en los ensayos anteriores (AB7, AB62, AB63, AB82, AS3, AB92 y AB26). En trabajos anteriores (Martinez Bermejo, 2008; Arroyo, 2012) los ensayos *in vitro* dieron resultados útiles para la selección de aislados para su posterior análisis *in vivo*. En este caso al no existir forma de priorizar el uso de unos u otros se ha optado por realizar los ensayos sobre un número limitado de patógenos. Los aislados patógenos que empleamos son *Alternaria*, *Botrytis* y *Penicillium*, elegidos por su importancia patológica en distintos cultivos tanto en precosecha como postcosecha. Los ensayos que realizamos se basan en la inoculación simultánea: aislados no patogénicos más aislados patogénicos (Coinoculación), (explicado en el apartado 4.5.1 de Material y Métodos). Se cuantificaron los daños a los 10 días y a los 30 días midiendo con una regla el diámetro de micelio o de mancha de la lesión sobre las naranjas que presentaba cada combinación.

Lesiones a los 10 días

Los datos que aparecen en la Tabla 14 son medias de las medidas (mm de diámetro de lesión) a los 10 días tras el corte y la coinoculación (Figura 15). Hay que señalar que en los controles sin no patógeno y sin patógeno el diámetro de lesión es prácticamente nulo como era de esperar. Sin embargo vemos que el fungicida comercial no tiene ningún efecto protector (especialmente notable en el caso de *Botrytis*) y por tanto al no servir de referencia se ha eliminado de los posteriores análisis estadísticos.



Figura 15: Lesiones a los 10 días en la combinación *Penicillium*-no patógeno.

Tabla 14: Medida de diámetro de lesión 10 días.

	<i>Alternaria</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Botrytis</i>	MEDIA
Control	0,0	0,0	1,0	0,3
Fungicida	2,0	4,3	59,3	21,9
AB92	2,7	8,7	3,7	5,0
AB82	6,7	6,0	3,3	5,3
AB7	3,0	11,7	4,3	6,3
AB62	5,0	6,3	12,3	7,9
AS3	5,0	14,7	5,7	8,5
AB26	3,7	8,0	17,0	9,6
AB63	3,3	10,3	23,3	12,3
SIN NP	3,7	8,0	38,5	16,7
MEDIA	4,1	9,2	13,5	
LSD	A	AB	B	

(1) Las Medias con diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas entre aislados patógenos (Test LSD, P=0,05)

(2) SIN NP (Control +)= sin no patógeno; Control: sin no patógeno y sin patógeno.

Los aislados de *F. oxysporum* que aparentemente frenaron más la propagación de lesión (micelio o mancha) de las naranjas a los 10 días fueron el AB92, presentando el menor diámetro de lesión con 5 mm, el siguiente aislado fue el AB82, con un diámetro de lesión de 5,3 ,si bien las diferencias no son estadísticamente significativas. Si comparamos con los valores obtenidos con la muestras sin no patógeno (solo el patógeno, control +) solamente en el caso de *Botrytis* se aprecia la reducción de los daños (Figura 16)

Por otro lado se puede observar que el aislado patógeno que menos diámetro de lesión produce a los 10 días en su combinación con cada uno de los aislados de *F.oxysporum* fue *Alternaria* y el de los mayores daños *Botrytis*.

Señalar que alguna de las combinaciones patógeno-no patógeno produce más daños que cuando las naranjas únicamente presentan las esporas del patógeno (SIN NP), a excepción de *Botrytis* tal como hemos comentado donde el daño que produce es mayor cuando se encuentra sólo (Figura 16).

El análisis estadístico realizado, consiste en un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores con la variable "lesión 10 días" (Tabla 15), considerando oportuno no contar con las mediciones del fungicida y del control (ambos datos aparecen en rojo en la tabla 14) para el cálculo de la estadística.

Tabla 15: Análisis de Varianza para lesión a los 10 días.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:NOPA	894,885	7	127,841	1,10	0,3815
B:PATO	969,555	2	484,778	4,16	0,0220
INTERACCIONES					
AB	2126,84	14	151,917	1,30	0,2432
RESIDUOS	5245,17	45	116,559		
TOTAL (CORREGIDO)	8833,33	68			

Estadísticamente puede decirse que hay diferencias significativas entre patógenos (resultando un p-valor de 0,0220), y no hay diferencias significativas entre no patógenos (resultando un p-valor de 0,3815). Se repitió el análisis con un sólo factor ("Pato" patógeno, que había resultado significativo) con resultados similares. Una vez realizada el ANOVA, se procedió a realizar un test LSD, para observar cómo eran las diferencias entre los patógenos (Tabla 14).

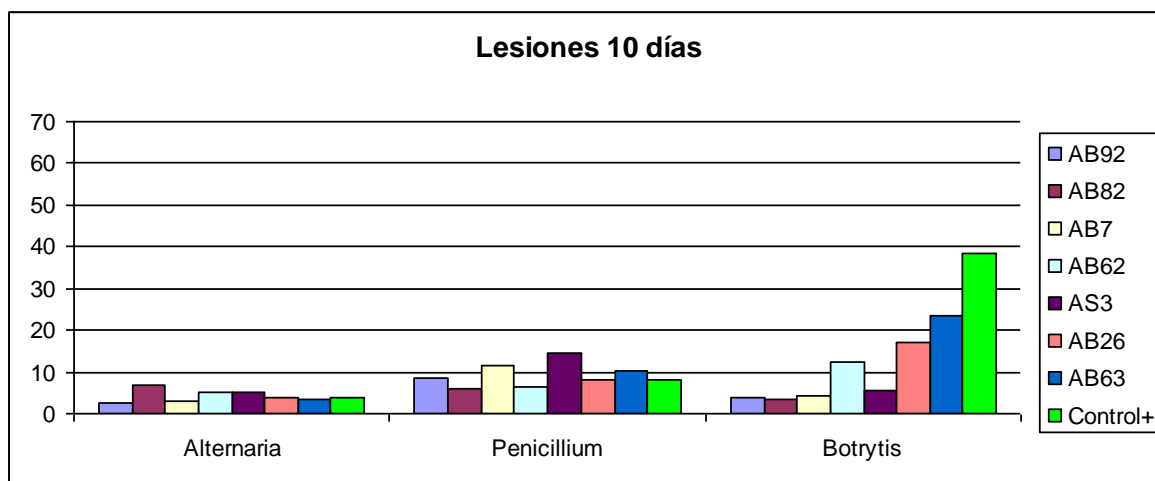


Figura 16: Valores medios (en mm) de las distintas combinaciones en la variable “lesión 10 días”.

En la Figura 16 se puede apreciar visualmente que las mejores combinaciones en naranja, y por tanto que presentaban el valor más bajo de la variable “lesión 10 días”, fueron las que presentaban esporas de *Alternaria* con cada uno de los aislados de *F.oxysporum*. Estadísticamente (test LSD, tabla 14) se ve reflejado en que las lesiones de *Alternaria* fueron significativamente menores que las de *Botrytis*. Sin embargo desde un punto de vista práctico no se aprecian diferencias estadísticas entre presencia y ausencia de no patógeno por lo que el control biológico está ausente aunque la apariencia de la gráfica de *Botrytis* parezca indicar lo contrario.

Para asegurarnos de esto se realizó un análisis usando de forma independiente los datos de cada patógeno sin que se apreciaran diferencias significativas (datos no mostrados).

Lesiones a los 30 días

A los 30 días procedimos a hacer una segunda medición del diámetro de lesión (Figura 17), la actuación fue similar a la que llevamos a cabo a los 10 días. Los datos que aparecen en la Tabla 16 son medias (mm de diámetro de lesión) a los 30 días tras el corte y la coinoculación.



Figura 17: Lesiones a los 30 días en la combinación *Botrytis*-no patógeno.

Tabla 16: Medida de diámetro de lesión 30 días.

	<i>Alternaria</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Penicillium</i>	MEDIA
Control	6,7	2,0	1,7	3,5
Fungicida	5,3	70,0	51,7	42,3
AB92	3,3	6,3	70,0	26,5
AB7	8,0	15,7	69,3	31,0
AB63	13,7	38,0	57,0	36,2
AS3	35,5	10,0	63,7	36,4
AB26	26,0	27,0	63,7	38,9
SIN NP	6,0	70,0	43,0	39,7
AB82	49,3	25,7	60,7	45,2
AB62	32,0	48,3	63,3	47,9
MEDIA	21,7	30,1	61,3	
LSD	A	A	B	

(1) Las medias con diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas entre aislados no patógenos (Test LSD, P=0,05)

(2) Las Medias con diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas entre aislados patógenos (Test LSD, P=0,05)

(3) SIN NP (Control +)= sin no patógeno; Control: sin no patógeno y sin patógeno.

Los aislados de *F. oxysporum* que aparentemente frenaron más la propagación de lesión (micelio o mancha) de las naranjas a los 30 días fueron el AB92, presentando el menor diámetro de lesión con 26,5 mm, el siguiente aislado fue el AB7, con un diámetro de lesión de 31mm.

El aislado patógeno que menos diámetro de lesión produce a los 30 días en su combinación con cada uno de los aislados no patógenicos fue *Alternaria* como a los 10 días pero en este caso las mayores lesiones correspondían a *Penicillium*.

Del mismo modo, hay combinaciones patógeno-no patógeno que produce más daños que cuando las naranjas únicamente presentan las esporas del patógeno (SIN NP, control +), a excepción de *Botrytis* en solitario que como los resultados a los 10 días su valor es mayor.

El análisis estadístico realizado, consiste en un análisis de la varianza de dos factores con la variable "lesión 30 días" (Tabla 17). Como en el caso anterior, teniendo en cuenta la ineficacia del fungicida para controlar el desarrollo fúngico, se consideró más apropiado excluir los datos correspondientes (datos en rojo en la tabla 16) en el cálculo estadístico para evitar que pudiera interferir en posibles interacciones. De la misma forma tampoco contaremos en la estadística con los datos del control.

Tabla 17: Análisis de Varianza para lesión a los 30 días.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:NOPA	2978,25	7	425,464	1,31	0,2695
B:PATO	20007,2	2	10003,6	30,74	0,0000
INTERACCIONES					
AB	11701,2	14	835,798	2,57	0,0087
RESIDUOS	14320,5	44	325,466		
TOTAL (CORREGIDO)	50145,7	67			

En este caso sí observamos diferencias altamente significativas entre patógenos (resultando un p-valor de 0,0000), y no hay diferencias significativas entre no patógenos (resultando un p-valor de 0,2695) aunque presentan interacción entre los dos factores. Una vez realizado el ANOVA, se procedió al test LSD, para ver las diferencias entre patógenos (Tabla 16).

En la Figura 18 se puede apreciar visualmente que las mejores combinaciones que presentaban el valor más bajo de la variable “lesión 30 días” en valor medio, fueron las de *Alternaria* con cada uno de los aislados de *F. oxysporum*. Sin embargo se observa muy claramente como en el caso anterior de los 10 días que *Botrytis* por si solo produce mayores daños que cuando está acompañado. Y en el caso de *Penicillium* la presencia del no patógeno tiene un efecto sinérgico produciendo mayores daños que pro si solo.

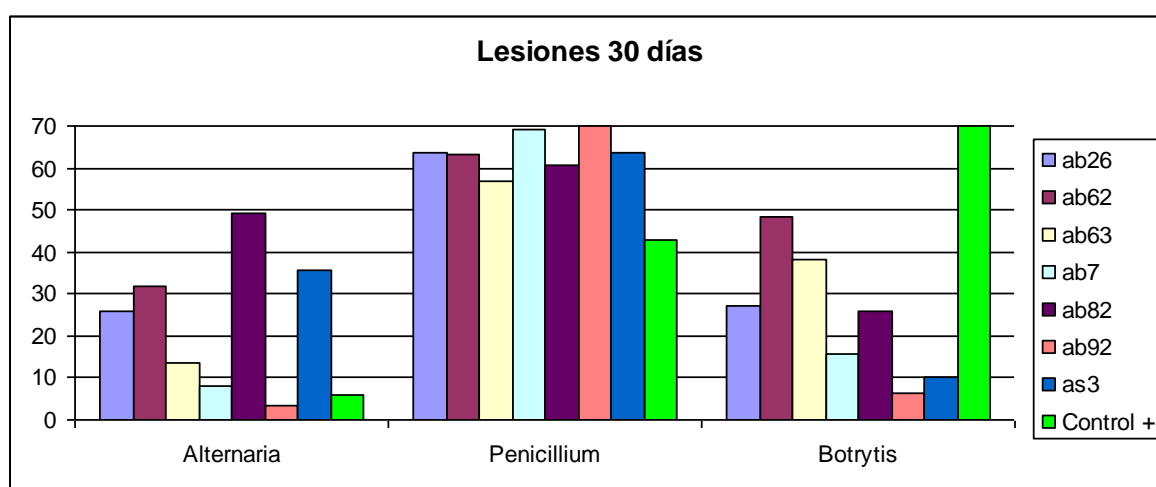


Figura 18: Valores medios de las distintas combinaciones en la variable “lesión 30 días”

El análisis LSD realizado, confirma estas observaciones y muestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre aislados patógenos, siendo *Alternaria* y *Botrytis* estadísticamente diferente a *Penicillium*.

Lo que si podemos observar en determinadas combinaciones es que el diámetro de lesión de la naranja es muy reducido, ejemplos serían la combinación AB92-*Alternaria* y AB7-*Botrytis*. Esto marca las distintas interacciones, pero en el caso de *Alternaria* no es diferente del control + (sólo patógeno) mientras que para *Botrytis* sí.

Si realizamos los análisis independientes (tablas no incluidas) de cada uno de los patógenos vemos que en el caso de *Alternaria* hay diferencias altamente significativas ($p=0,003$) y realizando un LSD vemos que las combinaciones son estadísticamente iguales salvo los combinados con AB62, AB82 y AS3 que producen lesiones mayores.

Para el caso de *Penicillium* los valores son significativos ($p=0,03$) y en este caso con la excepción de AB63 que da valores similares el resto produce lesiones de mayor tamaño.

Y por último el caso de *Botrytis* aun no teniendo diferencias estadísticas en su conjunto ($p=0,283$) el análisis de segmentación muestra que las lesiones de las combinaciones con AB92 y AS3 son de menor tamaño mientras que las demás son similares al patógeno sólo.

Por ello podemos deducir que el efecto que producen los no patógenos es en general perjudicial para la naranja con la excepción del ensayo de *Botrytis*. Sin embargo el uso de antagonistas como el AS3 o el AB92 que funcionan con este último no pueden usarse por el riesgo que conlleva una posible contaminación con otros oportunistas produciendo una acción sinérgica potenciando la destrucción de los frutos.

Otros estudios de control biológico en productos recolectados, como el empleo de *Metschnikowia pulcherrima* para el control de la podredumbre postcosecha (*Botrytis*) de uva (Parafati *et al.*, 2015), demuestran que la producción de compuestos orgánicos volátiles (COV) ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de patógenos sobre productos vegetales. También indica que *Aspergillus pullulans* es capaz de producir enzimas hidrolíticas que tienen la capacidad de colonizar las heridas causadas por los patógenos y que ejercen un biocontrol. En la misma línea, en el uso de organismos de control biológico para manejar enfermedades como la pudrición de la berenjena (Aktar *et al.*, 2014), a través de *Trichoderma harzianum*, observaron la

capacidad de controlar el crecimiento de hongos.

Aunque el uso de aislados no patógenos de *Fusarium* está bien documentado (Alves-Santos y Diez, 2011) en el control de patógenos vasculares y los trabajos previos con los aislados de este estudio (Martínez, 2008; Arroyo, 2012) dieron resultados prometedores en este campo, su uso como agentes de control postcosecha no es recomendable a la vista de los resultados. Tanto las pruebas realizadas in vitro como las realizadas sobre tejidos vivos indican el riesgo potencial de que estos aislados se comporten a su vez como oportunistas y ejerzan un efecto potenciador de los necrotrofos.

6. CONCLUSIONES

El estudio de las pruebas in vitro para la evaluación e identificación de los potencialmente mejores aislados no patogénicos de *Fusarium oxysporum* para el control biológico de patógenos fúngicos oportunistas ofreció las siguientes conclusiones:

1. El efecto inhibitorio del crecimiento micelial de los patógenos en placa causado por los aislados no patogénicos no presenta diferencias significativas entre los no patógenos y las diferencias entre patógenos pueden atribuirse a las características propias de los mismos.
2. El efecto inhibitorio de la germinación de esporas del patógeno por los aislados no patogénicos no es estadísticamente significativo desde el punto de vista de los no patógenos.
3. El efecto sobre la germinación de semillas de judía de la presencia conjunta de patógenos y no patógenos no es significativo estadísticamente, sin embargo si existen diferencias significativas en la viabilidad de las semillas desde el punto de vista de los no patógenos aunque en este caso la presencia de estos agrava los daños ocasionados por los patógenos.
4. Los resultados de las pruebas sobre material vegetal (naranja) indican que solo hay diferencias estadísticamente significativas para el factor patógeno pero existe una interacción fuerte de tal forma que analizando individualmente cada patógeno el efecto de los aislados de *Fusarium oxysporum* es perjudicial para *Alternaria* y *Penicillium* y es parcialmente beneficioso en el caso de *Botrytis* para los aislados AB92 y AS3.

5. Como conclusión final, el uso de aislados no patogénicos de *Fusarium oxysporum* aunque anteriormente se ha demostrado beneficioso frente a patógenos vasculares no es aconsejable para el control biológico de enfermedades oportunistas o postcosecha ya que estos aislados en vez de controlar la enfermedad producen un efecto sinérgico aumentando los daños.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G.N.; (2001). **Fitopatología**. Noriega editores 2ª edición. México.
- AKTAR, M. T.; HOSSAIN, K. S.; BASHAR, M. A. (2014). Antagonistic potential of rhizosphere fungi against leaf spot and fruit rot pathogens of brinjal. **Bangladesh Journal of Botany** **43.2**: 213-217
- ALABOUVETTE C., OLIVAIN C., MIGHELI Q. AND STEINBERG C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. **New Phytol.**, **184(3)**, 529.
- ALVES-SANTOS, F.M.; (1999). **La Fusariosis de la Judía en Castilla y León: Caracterización Molecular y Diagnóstico de los Patógenos**. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- ALVES-SANTOS, F.M. & DÍEZ, J.J. Eds (2011). **Control of Fusarium diseases**. Kerala (India). Research Signpost
- ARROYO-GALLARDO, V. (2012). **Estudio de aislados no patogénicos para el control biológico de la fusariosis vascular (*Fusarium oxysporum* f.sp.*batatas*) de planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*)**. Trabajo Fin de Carrera. E.T.S.I.I.A.A. Palencia.
- BAIRD, R.E.; MULLINIX, B.G.; PEERY, A.B.; LANG, M.L.; (1997). Diversity and longevity of the soybean debris Mycobiota in a no-tillage system. **Plant Dis.** **81**: 530-634.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J.; (1974) **Biological control of plant pathogens**. W. H. Freeman, San Francisco.
- DEAN, R., VAN KAN, J. A. L., PRETORIUS, Z. A., HAMMOND-KOSACK, K. E., DI PIETRO, A., SPANU, P. D., RUDD, J. J., DICKMAN, M., KAHMANN, R., ELLIS, J. and FOSTER, G. D. (2012), The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, **13**: 414–430. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x
- DEVAY, J.E.; GUTIÉRREZ, A.P.; PULLMAN, G.S.; WAKEMAN, R.J.; GARBER, R.H.; JEFFERS, D.P.; SMITH, S.N.; GOODELL, P.B.; ROBERTS, P.A.; (1997). Inoculations densities of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* and *Meloydogyne*

- incognita* in relation to the development of *Fusarium* wilt and the phenology of cotton plants (*Gossypium hirsutum*). **Ecology and Epidemiology**, **87**, Nº 34: 341-346.
- DIEDHIU, P.M.; HALLMANN, J.; OERKE, E.C.; DEHNE, H.W.; (2003). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and a non pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloydogyne incognita* infestation of tomato. **Mycorrhiza**, **13**: 199-204.
- EDEL, V., STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; RECORBET, G.; ALABOUVETTE, C.; (2001). Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France. **FEMS Microbiology Ecology**, **36**: 61-71.
- ELAD, Y. (2003). Biocontrol of foliar pathogens: mechanisms and application. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, Gent**, v.68: 17-24.
- GREEN, F.; JUSTER, T.; FERGE, L.; HIGHLEY, T.L.; (1997). Protection of southern pine from fungal decay and termite damage with N, N-naphthaloyhydroxylamine. **Biodeterioration and Biodegradation**, **39**:103-111.
- HERVÁS, A.; LANDA, B.; DATNOFF, L.E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.; (1998). Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. **Biol. Control.**, **13**: 166-176.
- JAMES, R.; BARKER, K.; (1983). **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. APS PRESS. *The American Phytopathological Society*. ST. Paul, Minnesota.
- JARVIS, W.; (1998). **Control de enfermedades en cultivos de invernadero**. Ediciones mundiprensa. *The American Phytopathological Society*.
- LALUK, K., & MENGISTE, T. (2010). Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion? **The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists**, **8**, e0136. doi:10.1199/tab.0136
- LARKIN, R.P.; HOPKINS, D.L.; MARTIN, F.N.; (1996). Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. **Phytopathology**, **86**: 812-819.
- LEMANCEAU, P.; BAKKER, P.A.H.M.; KOGEL, W.J. DE; ALABOUVETTE, C.; SCHIPPERS, B.; (1992). Effect of psudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of *Fusarium* wilt of carnation by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **App. and Env. Microbiology**, **58**: 2978-2982.

- LEMANCEAU, P.; BAKKER, P.A.H.M.; KOGEL, W.J. DE; ALABOUVETTE, C.; SCHIPPERS, B.; (1993). Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and Pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. **App. and Env. Microbiology**, **59**: 74-82
- MANDEEL, Q.A.; (2006). Influence of plant root exudes, germ tube orientation and passive conidia transport on biological control of fusarium wilt by strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. **Mycopathologia**, **161**: 173-182.
- MANDEEL, Q.A.; (2007). Modeling competition for infection sites on roots by nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Mycopathologia**, **163**: 9-20.
- MARTÍN, J.; (2004). **Evaluación del antagonismo “in vitro” de Hongos ectomicorrícicos comestibles sobre el crecimiento micelial y germinación esporal de *Fusarium oxysporum* Schlecht. “in vivo” sobre la germinación de *Quercus ilex* y *Quercus pyrenaica***. Trabajo Fin de Carrera. E.T.S.I.I.A.A. Palencia.
- MARTÍNEZ-BERMEJO, D. (2008) .**Estudio de los aislados no patogénicos para el control biológico de la fusariosis vascular *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* de la judía *Phaseolus vulgaris***. Trabajo Fin de Carrera. E.T.S.I.I.A.A. Palencia.
- MARX, D.H.; (1972). Ectomycorrhizae as biological deterrants to pathogenic root infections. **Ann. Rev. Phytopath.**, **10**: 429-454.
- MARX, D.H.; (1973). Mycorrhizae and feeder root diseases. In: MARKS, G.C., KOZLOWSKI, T.T. (eds.): **Ectomycorrhizae- their ecology and physiology**,: 351-382. Academic Press.
- MELGAREJO, P.; DE CAL, A.; M.-SAGASTA, E.; (1989). Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. **Can. J. Bot.**, **67**: 83-87.
- MIRÓN HERNÁNDEZ, A.; CULVER GONZÁLEZ, M. DE LA O; LAGOMA LORÉN, LUIS; ASENSIO CRISTÓBAL, LUIS. 2014. Coordinadora: Asunción Mirón Hernández. **DATABIO: Fichas de agentes biológicos**. Edita: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Depósito Legal: M-22512-2014
- PANEBIANCO, S.; VITALE, A.; POLIZZI, G.; ET AL. (2015). Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents. **Biological Control** **84**: 19-27

- PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; *ET AL.*(2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape . **Food Microbiology** **47**: 85-92
- PAVÓN MORENO, M.A. 2013. **Detección de *Alternaria* spp mediante técnicas genéticas como índice de calidad de materias primas y marcador de bioseguridad en productos hortofrutícolas frescos y procesados.** Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid
- SANTANDER GORDON, D.I.; (2014). **Estudio del metabolismo del óxido nítrico (NO) en *Botrytis cinerea*: mecanismos de producción y efectos fisiológicos.** Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N.; (1940). The species concept in *Fusarium*. **Am. J. Bot.**, **27**: 64-67.
- ULHOA, C.J.; (1996). Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. P. 234-238 en V sincobiol Simposio de controle biológico. Anais: Conferencias y palestras. Foz de Iguacu-Panama-Brasil.
- VAN ETEN, H.D.; MATTHEWS, D.E.; MATTHEWS, P.S.; (1989). Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. **Annu. Rev. Phytopathol.**, **27**: 143-164.
- MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ (2010). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas Parte 2. **Medicina & laboratorio, Colombia, Vol. 16 Num. 9-10**: 469-488
- VERO, S.; MONDINO, P.; (1999). Control biológico postcosecha en Uruguay. **Horticultura Internacional.**, **26**.: 33-36
- WATANABE, T.; (1994). **Pictorial atlas of Soil and Seed Fungi.** Lewis publishers. Florida.

Bibliografía Web

GIUSIANO, G. E. **Apuntes “Micosis Oportunistas”**. Profesor Adjunto Cátedra Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina (UNNE).Argentina.
<http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Micosis%20oportunistas.pdf>

GARCÍA-PANTALEÓN, F.I. Y MEDIAVILLA MOLINA, A. **Recurso web**. Grupo de Aerobiología Univ. de Córdoba..
<http://www.uco.es/aerobiologia/hongos/cladospo.htm>

Departamento de Protección Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de la RepúblicaUruguay.
<http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicas/cbiologico.html>