



**IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES AGENTES  
DE CONTROL BIOLÓGICO Y EFECTO DE SUS  
METABOLITOS PRODUCIDOS EN EL  
CONTROL DE PATÓGENOS**

MONOGRÁFICO

INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA  
ESPECIALIDAD HORTOFRUTICULTURA Y JARDINERÍA

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Alumno: Francisco Javier Ferrón Sánchez

Directores: Dra. Dña. Milagrosa Santos Hernández  
D. Francisco José Carretero Esteban

Almería, Abril de 2013

# Índices

---

<b>1. ÍNDICE GENERAL .....</b>	<b>2</b>
<b>A. ÍNDICE FOTOGRAFÍAS .....</b>	<b>14</b>
<b>B. ÍNDICE IMÁGENES .....</b>	<b>16</b>
<b>C. ÍNDICE CUADROS .....</b>	<b>18</b>
<b>D. ÍNDICE FIGURAS .....</b>	<b>19</b>
<b>E. ÍNDICE GRÁFICAS .....</b>	<b>20</b>

<b>1. ÍNDICE GENERAL</b>	
<b>2. INTERÉS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
2.1. INTERÉS .....	32
2.2. OBJETIVOS .....	33
<b>3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>34</b>
3.1. CONTROL BIOLÓGICO .....	35
3.1.1. Introducción .....	35
3.1.2. Agentes de control biológico (ACB) .....	36
3.1.3. Suelos supresivos .....	37
3.1.4. Mecanismos de control biológico .....	38
3.1.4.1. Competencia por los recursos .....	39

---

3.1.4.2. Micoparasitismo .....	39
3.1.4.3. Antibiosis .....	40
3.1.5. <i>Trichoderma</i> y <i>Paecilomyces</i> en la agricultura .....	41
3.1.5.1. <i>Trichoderma</i> sp. ....	41
3.1.5.2. <i>Paecilomyces</i> sp. ....	44
3.2. USO DE ANÁLISIS MOLECULARES EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS .....	46
3.2.1. ARN ribosomal y secuencias ITS .....	46
3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	49
3.2.3. Amplificación al azar de ADN polimórfico mediante PCR (RAPD-PCR) .	52
3.3. PATÓGENOS DE IMPORTANCIA EN LOS PRINCIPALES CULTIVOS HORTÍCOLAS .....	54
3.3.1. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	54
3.3.1.1. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	54
3.3.1.2. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> .....	55
3.3.2. <i>Fusarium solani</i> .....	55
3.3.3. <i>Pythium</i> sp. ....	56
3.3.4. <i>Phytophthora parasitica</i> .....	58
3.3.5. <i>Botrytis cinerea</i> .....	59



---

3.3.6. <i>Verticillium dahliae</i> .....	59
3.3.7. <i>Dydimella bryoniae</i> .....	61
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>62</b>
4.1. INTRODUCCIÓN .....	63
4.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS CON ALTA CAPACIDAD ANTAGONISTA IN VITRO DE PATÓGENOS MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES .....	63
4.2.1. Incubación de aislados .....	64
4.2.2. Extracción de ADN .....	64
4.2.2.1. Electroforesis del ADN .....	65
4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR .....	66
4.2.3.1. Electroforesis de los productos de la PCR .....	68
4.2.3.2. Secuenciación de las bandas amplificadas .....	68
4.2.4. Amplificación de fragmentos polimórficos de ADN mediante PCR: Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR) .....	68
4.2.4.1. Electroforesis de los productos de la RAPD-PCD .....	68
4.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS METABOLITOS NO VOLÁTILES PRODUCIDOS POR DIFERENTES HONGOS ANTAGONISTAS PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO MICELIAL IN VITRO DE CIERTOS PATÓGENOS .....	69
4.3.1. Incubación de antagonistas .....	70

---

4.3.2. Preparación del medio de cultivo .....	70
4.3.3. Procesado y adición de extractos .....	71
4.3.4. Inoculación de patógenos .....	71
4.4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS METABOLITOS VOLÁTILES PRODUCIDOS POR DIFERENTES HONGOS ANTAGONISTAS PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO MICELIAL IN VITRO DE CIERTOS PATÓGENOS .....	72
4.4.1. Inoculación de patógenos y antagonistas .....	73
4.4.2. Enfrentamiento patógeno-antagonista .....	73
4.5. MEDIOS DE CULTIVO .....	74
4.5.1. Medio de cultivo P.D.A. (patata-dextrosa-agar) .....	74
4.5.2. Medio de cultivo P.D. (patata-dextrosa) .....	74
4.5.3. Medio de cultivo A.M. (agar-malta) .....	74
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>75</b>
5.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS .....	76
5.1.1. Estudio de identificación específica .....	76
5.1.1.1. Secuencias de los aislados del género <i>Trichoderma</i> .....	76
5.1.1.1.1. Secuenciación del fragmento correspondiente a T1- ITS4 .....	76
5.1.1.1.2. Secuenciación del fragmento correspondiente a T2- ITS1 .....	80
5.1.1.2. Secuencias de los aislados del género <i>Paecilomyces</i> .....	83

---

5.1.1.2.1. Secuenciación del fragmento correspondiente a P1- ITS1 .....	83
5.1.1.2.2. Secuenciación del fragmento correspondiente a P2- ITS4 .....	87
5.1.1.2.3. Secuenciación del fragmento correspondiente a P3- ITS4 .....	90
5.1.1.2.4. Secuenciación del fragmento correspondiente a P4- ITS4 .....	93
5.1.1.3. Resumen de la identificación específica .....	96
5.1.2. Estudio de la variabilidad genética de los aislados .....	96
5.1.2.1. Variabilidad genética de los aislados del género <i>Trichoderma</i> .....	97
5.1.2.2. Variabilidad genética de los aislados del género <i>Paecilomyces</i> .....	98
5.2. EFECTO ANTAGONISTA DE LOS METABOLITOS NO VOLÁTILES...	99
5.2.1. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a <i>F. o. f. sp. niveum</i> .....	100
5.2.1.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> .....	100
5.2.1.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	100
5.2.1.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	101
5.2.1.2. Evolución del crecimiento micelial .....	102
5.2.1.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	102
5.2.1.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	103

---

5.2.2. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> .....	106
5.2.2.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> .....	106
5.2.2.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	106
5.2.2.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	107
5.2.2.2. Evolución del crecimiento micelial .....	108
5.2.2.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	108
5.2.2.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	109
5.2.3. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a <i>F. solani</i> .....	111
5.2.3.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> .....	111
5.2.3.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. solani</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	111
5.2.3.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. solani</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	112
5.2.3.2. Evolución del crecimiento micelial .....	113
5.2.3.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>F. solani</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	113

---

5.2.3.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>F. solani</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	114
5.2.4. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a <i>D. bryoniae</i> .....	117
5.2.4.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> .....	117
5.2.4.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	117
5.2.4.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	118
5.2.4.2. Evolución del crecimiento micelial .....	119
5.2.4.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	119
5.2.4.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	121
5.2.5. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a <i>P. parasitica</i> .....	126
5.2.5.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> .....	126
5.2.5.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	126
5.2.5.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	127
5.2.5.2. Evolución del crecimiento micelial .....	128

---

5.2.5.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	128
5.2.5.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	130
5.2.6. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a <i>V. dahliae</i> .....	135
5.2.6.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> .....	135
5.2.6.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	135
5.2.6.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	136
5.2.6.2. Evolución del crecimiento micelial .....	137
5.2.6.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	137
5.2.6.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	139
5.2.7. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a <i>B. cinerea</i> .....	144
5.2.7.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> .....	144
5.2.7.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	144
5.2.7.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	145

---

5.2.7.2. Evolución del crecimiento micelial .....	146
5.2.7.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	146
5.2.7.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	148
5.2.8. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a <i>Pythium</i> sp. ....	152
5.2.8.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> .....	152
5.2.8.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Pythium</i> sp. frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	152
5.2.8.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Pythium</i> sp. frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	153
5.2.8.2. Evolución del crecimiento micelial .....	154
5.2.8.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>Pythium</i> sp. frente a dos aislados de <i>T. saturnisporum</i> .....	154
5.2.8.2.1. Evolución del crecimiento micelial de <i>Pythium</i> sp. frente a cuatro aislados de <i>P. variotii</i> .....	156
5.2.9. Resumen del ensayo sobre el efecto antagonista de los metabolitos no volátiles .....	160
5.3. EFECTO ANTAGONISTA DE LOS METABOLITOS VOLÁTILES .....	161
5.3.1. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a <i>F. o. f. sp. niveum</i> .....	161

---

5.3.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> frente a los microorganismos aislados .....	161
5.3.1.2. Evolución del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> frente a los microorganismos aislados .....	162
5.3.2. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> .....	163
5.3.2.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> frente a los microorganismos aislados .....	163
5.3.2.2. Evolución del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> frente a los microorganismos aislados .....	164
5.3.3. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a <i>F. solani</i> .....	165
5.3.3.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. solani</i> frente a los microorganismos aislados .....	165
5.3.3.2. Evolución del crecimiento micelial de <i>F. solani</i> frente a los microorganismos aislados .....	166
5.3.4. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a <i>D. bryoniae</i> .....	167
5.3.4.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> frente a los microorganismos aislados .....	167
5.3.4.2. Evolución del crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> frente a los microorganismos aislados .....	168
5.3.5. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a <i>P. parasitica</i> .....	169



---

5.3.5.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> frente a los microorganismos aislados .....	169
5.3.5.2. Evolución del crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> frente a los microorganismos aislados .....	170
5.3.6. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a <i>V. dahliae</i> .....	171
5.3.6.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> frente a los microorganismos aislados .....	171
5.3.6.2. Evolución del crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> frente a los microorganismos aislados .....	172
5.3.7. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a <i>B. cinerea</i> .....	173
5.3.7.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> frente a los microorganismos aislados .....	173
5.3.7.2. Evolución del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> frente a los microorganismos aislados .....	174
5.3.8. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a <i>Pythium</i> sp. ....	175
5.3.8.1. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Pythium</i> sp. frente a los microorganismos aislados .....	175
5.3.8.2. Evolución del crecimiento micelial de <i>Pythium</i> sp. frente a los microorganismos aislados .....	176
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>178</b>

---

6.1. ENSAYO SOBRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS AISLADOS .....	179
6.2. ENSAYO SOBRE EL EFECTO ANTAGONISTA DE LOS METABOLITOS NO VOLÁTILES .....	180
6.3. ENSAYO SOBRE EL EFECTO ANTAGONISTA DE LOS METABOLITOS VOLÁTILES .....	181
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>183</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>185</b>

## A. ÍNDICE FOTOGRAFÍAS

<b>Foto n° 1.</b> Crecimiento <i>in vitro</i> de uno de los aislados del género <i>Trichoderma</i> ..	41
<b>Foto n° 2.</b> Crecimiento <i>in vitro</i> de uno de los aislados del género <i>Paecilomyces</i> ..	44
<b>Foto n° 3.</b> Crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> sobre PDA con un 25% de extracto esterilizado del aislado T1 comparado con el testigo. ....	101
<b>Foto n° 4.</b> Crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> sobre PDA con un 5% y un 25% de extracto microfiltrado, respectivamente, del aislado P1 comparado con el testigo .....	102
<b>Foto n° 5.</b> Crecimiento micelial de <i>F. solani</i> sobre PDA con un 50% de extracto microfiltrado del aislado T2 comparado con el testigo .....	112
<b>Foto n° 6.</b> Crecimiento micelial de <i>F. solani</i> sobre PDA con un 50% de extracto microfiltrado del aislado P3 comparado con el testigo .....	113
<b>Foto n° 7.</b> Crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> sobre PDA con un 50% de extracto microfiltrado del aislado T2 comparado con el testigo .....	118
<b>Foto n° 8.</b> Crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> sobre PDA con un 50% de extracto microfiltrado del aislado P2 comparado con el testigo .....	119
<b>Foto n° 9.</b> Crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> sobre PDA con un 5% de extracto microfiltrado del aislado T1 comparado con el testigo .....	127
<b>Foto n° 10.</b> Crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> sobre PDA con un 5% de extracto esterilizado del aislado P2 comparado con el testigo .....	128
<b>Foto n° 11.</b> Crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> sobre PDA con un 5% de extracto esterilizado del aislado T1 comparado con el testigo .....	136

---

<b>Foto nº 12.</b> Crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> sobre PDA con un 10% de extracto microfiltrado del aislado P1 comparado con el testigo .....	137
<b>Foto nº 13.</b> Crecimiento micelial de <i>Pythium</i> sp. sobre PDA con un 25% de extracto esterilizado del aislado T1 comparado con el testigo .....	153
<b>Foto nº 14.</b> Crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> frente al aislado T1 comparado con el testigo .....	162
<b>Foto nº 15.</b> Crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> frente al aislado T1 comparado con el testigo .....	163
<b>Foto nº 16.</b> Crecimiento micelial de <i>F. solani</i> frente al aislado P2 comparado con el testigo .....	165
<b>Foto nº 17.</b> Crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> frente al aislado T2 comparado con el testigo .....	168
<b>Foto nº 18.</b> Crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> frente al aislado T1 comparado con el testigo .....	169
<b>Foto nº 19.</b> Crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> frente al aislado T1 comparado con el testigo .....	171
<b>Foto nº 20.</b> Crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> frente al aislado P3 comparado con el testigo .....	173
<b>Foto nº 21.</b> Crecimiento micelial de <i>Pythium</i> sp. frente al aislado P3 comparado con el testigo .....	175

## B. ÍNDICE IMÁGENES

<b>Imagen nº 1.</b> Secuenciación del fragmento ITS4 correspondiente al aislado T1 .	77
<b>Imagen nº 2.</b> Alineamiento de la secuencia ITS4 del aislado T1 en la base de datos del NCBI .....	78
<b>Imagen nº 3.</b> Árbol filogenético de <i>T. saturnisporum</i> (lcl 16143) .....	79
<b>Imagen nº 4.</b> Secuenciación del fragmento ITS1 correspondiente al aislado T2 .	80
<b>Imagen nº 5.</b> Alineamiento de la secuencia ITS1 del aislado T2 en la base de datos del NCBI .....	81
<b>Imagen nº 6.</b> Árbol filogenético de <i>T. saturnisporum</i> (lcl 64675) .....	82
<b>Imagen nº 7.</b> Secuenciación del fragmento ITS1 correspondiente al aislado P1 .	83
<b>Imagen nº 8.</b> Alineamiento de la secuencia ITS1 del aislado P1 en la base de datos del NCBI .....	84
<b>Imagen nº 9.</b> Árbol filogenético de <i>P. variotii</i> (lcl 11865) .....	86
<b>Imagen nº 10.</b> Secuenciación del fragmento ITS4 correspondiente al aislado P2	87
<b>Imagen nº 11.</b> Alineamiento de la secuencia ITS4 del aislado P2 en la base de datos del NCBI .....	88
<b>Imagen nº 12.</b> Árbol filogenético de <i>P. variotii</i> (lcl 59627) .....	89
<b>Imagen nº 13.</b> Secuenciación del fragmento ITS4 correspondiente al aislado P3	90
<b>Imagen nº 14.</b> Alineamiento de la secuencia ITS4 del aislado P3 en la base de datos del NCBI .....	91
<b>Imagen nº 15.</b> Árbol filogenético de <i>P. variotii</i> (lcl 43755) .....	92

---

<b>Imagen n° 16.</b> Secuenciación del fragmento ITS4 correspondiente al aislado P4	93
<b>Imagen n° 17.</b> Alineamiento de la secuencia ITS4 del aislado P4 en la base de datos del NCBI .....	94
<b>Imagen n° 18.</b> Árbol filogenético de <i>P. variotii</i> (lcl 2963) .....	95

---

**C. ÍNDICE CUADROS**

<b>Cuadro nº 1.</b> Reactivos y cantidades necesarias para la reacción de PCR .....	67
<b>Cuadro nº 2.</b> Cálculo de cantidades de extracto y PDA .....	70
<b>Cuadro nº 3.</b> Resumen de los resultados de la identificación específica .....	96
<b>Cuadro nº 4.</b> Resumen del ensayo sobre el efecto antagonista de los metabolitos .....	160
<b>Cuadro nº 5.</b> Resumen del ensayo sobre el efecto antagonista de los metabolitos volátiles .....	177
<b>Cuadro nº 6.</b> Resultados del ensayo sobre variabilidad genética.....	180

**D. ÍNDICE FIGURAS**

<b>Figura nº 1.</b> Estructura de un ribosoma eucarionte .....	47
<b>Figura nº 2.</b> Localización de los cebadores ITS1 e ITS4 en el ADNr nuclear y mitocondrial .....	48
<b>Figura nº 3.</b> Variación de temperaturas para un solo ciclo de PCR .....	50
<b>Figura nº 4.</b> Variación de temperatura a lo largo de toda la amplificación .....	51
<b>Figura nº 5.</b> Pasos seguidos en el ensayo sobre identificación y caracterización de aislados .....	63
<b>Figura nº 6.</b> Pasos seguidos en el ensayo sobre el efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados .....	69
<b>Figura nº 7.</b> Planteamiento experimental del ensayo sobre metabolitos volátiles.	72
<b>Figura nº 8.</b> Colocación de las placas para la evaluación de los metabolitos volátiles .....	73
<b>Figura nº 9.</b> Visualización de los productos de la RAPD-PCR para los aislados del género <i>Trichoderma</i> .....	97
<b>Figura nº 10.</b> Visualización de los productos de la RAPD-PCR para los aislados del género <i>Paecilomyces</i> .....	98



## E. ÍNDICE GRÁFICAS

<b>Gráfica nº 1.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> frente a dos cepas de <i>T. saturnisporum</i> .....	100
<b>Gráfica nº 2.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> frente a cuatro cepas de <i>P. variotii</i> .....	101
<b>Gráfica nº 3.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> (testigo) .....	102
<b>Gráfica nº 4.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> (testigo) .....	103
<b>Gráfica nº 5.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> (testigo) .....	103
<b>Gráfica nº 6.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> (testigo) .....	104
<b>Gráfica nº 7.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> (testigo) .....	104
<b>Gráfica nº 8.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> (testigo) .....	105
<b>Gráfica nº 9.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> frente a dos cepas de <i>T. saturnisporum</i> .....	106

---

<b>Gráfica nº 10.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> frente a cuatro cepas de <i>P. variotii</i> .....	107
<b>Gráfica nº 11.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> (testigo) .....	108
<b>Gráfica nº 12.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> (testigo) .....	108
<b>Gráfica nº 13.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> (testigo) .....	109
<b>Gráfica nº 14.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> (testigo) .....	109
<b>Gráfica nº 15.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> (testigo) .....	110
<b>Gráfica nº 16.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> (testigo) .....	110
<b>Gráfica nº 17.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>F. solani</i> frente a dos cepas de <i>T. saturnisporum</i> .....	111
<b>Gráfica nº 18.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>F. solani</i> frente a cuatro cepas de <i>P. variotii</i> .....	112
<b>Gráfica nº 19.</b> Crecimiento de <i>F. solani</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>F. solani</i> (testigo) .....	113

---

<b>Gráfica n° 20.</b> Crecimiento de <i>F. solani</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>F. solani</i> (testigo) .....	114
<b>Gráfica n° 21.</b> Crecimiento de <i>F. solani</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>F. solani</i> (testigo) .....	114
<b>Gráfica n° 22.</b> Crecimiento de <i>F. solani</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>F. solani</i> (testigo) .....	115
<b>Gráfica n° 23.</b> Crecimiento de <i>F. solani</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>F. solani</i> (testigo) .....	115
<b>Gráfica n° 24.</b> Crecimiento de <i>F. solani</i> en PDA con diferentes tratamientos del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>F. solani</i> (testigo) .....	116
<b>Gráfica n° 25.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> frente a dos cepas de <i>T. saturnisporum</i> .....	117
<b>Gráfica n° 26.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> frente a cuatro cepas de <i>P. variotii</i> .....	118
<b>Gráfica n° 27.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	119
<b>Gráfica n° 28.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	120
<b>Gráfica n° 29.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	120

---

<b>Gráfica n° 30.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	121
<b>Gráfica n° 31.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	121
<b>Gráfica n° 32.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	122
<b>Gráfica n° 33.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	122
<b>Gráfica n° 34.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	123
<b>Gráfica n° 35.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	123
<b>Gráfica n° 36.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	124
<b>Gráfica n° 37.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	124
<b>Gráfica n° 38.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	125

---

<b>Gráfica n° 39.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> frente a dos cepas de <i>T. saturnisporum</i> .....	126
<b>Gráfica n° 40.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> frente a cuatro cepas de <i>P. variotii</i> .....	127
<b>Gráfica n° 41.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	128
<b>Gráfica n° 42.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	129
<b>Gráfica n° 43.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	129
<b>Gráfica n° 44.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	130
<b>Gráfica n° 45.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	130
<b>Gráfica n° 46.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	131
<b>Gráfica n° 47.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	131

---

<b>Gráfica n° 48.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	132
<b>Gráfica n° 49.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	132
<b>Gráfica n° 50.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	133
<b>Gráfica n° 51.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	133
<b>Gráfica n° 52.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	134
<b>Gráfica n° 53.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> frente a dos cepas de <i>T. saturnisporum</i> .....	135
<b>Gráfica n° 54.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> frente a cuatro cepas de <i>P. variotii</i> .....	136
<b>Gráfica n° 55.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	137
<b>Gráfica n° 56.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	138

---

<b>Gráfica nº 57.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	138
<b>Gráfica nº 58.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	139
<b>Gráfica nº 59.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	139
<b>Gráfica nº 60.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	140
<b>Gráfica nº 61.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	140
<b>Gráfica nº 62.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	141
<b>Gráfica nº 63.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	141
<b>Gráfica nº 64.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	142
<b>Gráfica nº 65.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	142

---

<b>Gráfica nº 66.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	143
<b>Gráfica nº 67.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> frente a dos cepas de <i>T. saturnisporum</i> .....	144
<b>Gráfica nº 68.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> frente a cuatro cepas de <i>P. variotii</i> .....	145
<b>Gráfica nº 69.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	146
<b>Gráfica nº 70.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	146
<b>Gráfica nº 71.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	147
<b>Gráfica nº 72.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	147
<b>Gráfica nº 73.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	148
<b>Gráfica nº 74.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	148



---

<b>Gráfica n° 75.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	149
<b>Gráfica n° 76.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	149
<b>Gráfica n° 77.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	150
<b>Gráfica n° 78.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	150
<b>Gráfica n° 79.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	151
<b>Gráfica n° 80.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	151
<b>Gráfica n° 81.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Pythium</i> sp. frente a dos cepas de <i>T. saturnisporum</i> .....	152
<b>Gráfica n° 82.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Pythium</i> sp. frente a cuatro cepas de <i>P. variotii</i> .....	153
<b>Gráfica n° 83.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	154

---

<b>Gráfica n° 84.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T1 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	154
<b>Gráfica n° 85.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	155
<b>Gráfica n° 86.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T2 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	155
<b>Gráfica n° 87.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	156
<b>Gráfica n° 88.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P1 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	156
<b>Gráfica n° 89.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	157
<b>Gráfica n° 90.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P2 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	157
<b>Gráfica n° 91.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	158
<b>Gráfica n° 92.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P3 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	158

---

<b>Gráfica nº 93.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	159
<b>Gráfica nº 94.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P4 comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	159
<b>Gráfica nº 95.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. niveum</i> frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados .....	161
<b>Gráfica nº 96.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> frente a los diversos aislados comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. niveum</i> (testigo) .....	162
<b>Gráfica nº 97.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados .....	163
<b>Gráfica nº 98.</b> Crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> frente a los diversos aislados comparado con el crecimiento de <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> (testigo) .....	164
<b>Gráfica nº 99.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>F. solani</i> frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados .....	165
<b>Gráfica nº 100.</b> Crecimiento de <i>F. solani</i> frente a los diversos aislados comparado con el crecimiento de <i>F. solani</i> (testigo) .....	166
<b>Gráfica nº 101.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>D. bryoniae</i> frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados .....	167
<b>Gráfica nº 102.</b> Crecimiento de <i>D. bryoniae</i> frente a los diversos aislados comparado con el crecimiento de <i>D. bryoniae</i> (testigo) .....	168
<b>Gráfica nº 103.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>P. parasitica</i> frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados .....	169

---

<b>Gráfica nº 104.</b> Crecimiento de <i>P. parasitica</i> frente a los diversos aislados comparado con el crecimiento de <i>P. parasitica</i> (testigo) .....	170
<b>Gráfica nº 105.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>V. dahliae</i> frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados .....	171
<b>Gráfica nº 106.</b> Crecimiento de <i>V. dahliae</i> frente a los diversos aislados comparado con el crecimiento de <i>V. dahliae</i> (testigo) .....	172
<b>Gráfica nº 107.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados .....	173
<b>Gráfica nº 108.</b> Crecimiento de <i>B. cinerea</i> frente a los diversos aislados comparado con el crecimiento de <i>B. cinerea</i> (testigo) .....	174
<b>Gráfica nº 109.</b> % de inhibición del crecimiento micelial de <i>Pythium</i> sp. frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados .....	175
<b>Gráfica nº 110.</b> Crecimiento de <i>Pythium</i> sp. frente a los diversos aislados comparado con el crecimiento de <i>Pythium</i> sp. (testigo) .....	176

# **Interés y objetivos**

## 2.1. INTERÉS

En los últimos años se viene observando una disminución en el uso de productos fitosanitarios para el control de enfermedades. Esto es debido a la pérdida de efectividad de los agroquímicos por la aparición de nuevas cepas de patógenos resistentes, a la tendencia del mercado a demandar productos libres de residuos y al importante daño medioambiental causado, entre otros factores.

Determinados microorganismos juegan un papel importante en la regulación natural de las poblaciones de patógenos. Por ello, el uso de agentes de control biológico se muestra como un complemento o alternativa al control químico (Santos *et al.*, 2010), haciendo necesaria la búsqueda de organismos capaces de controlar las principales enfermedades de los cultivos.

Los microorganismos antagonistas presentan una serie de mecanismos mediante los cuales ejercen su efecto biorregulador, como son la competencia directa por el espacio y los nutrientes; la secreción extracelular de enzimas hidrolíticas como quitinasas, celulasas, etc.; el parasitismo directo; y la producción de sustancias antibióticas, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Ajith y Lakshmidēvi, 2010). Además, ciertos microorganismos crean un ambiente favorable a la planta, con mecanismos como la inducción de resistencia y la solubilización de nutrientes no accesibles en su forma original por la planta (Benítez *et al.*, 2004).

La caracterización de las distintas especies fúngicas ha estado basada principalmente en criterios como el tamaño de las conidias, el color y la forma, el patrón y la frecuencia de ramificación del micelio y otras características morfológicas que no son muy fiables. Estudios recientes recurren a métodos moleculares basados en la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) por su alta fiabilidad en la identificación de especies (Maymon *et al.*, 2004).

Tras el estudio por Santos *et al.* (2009) de suelos supresivos a la fusariosis vascular se pudieron aislar una serie de microorganismos con una alta capacidad antagonista *in vitro* frente a diferentes fitopatógenos, mostrando algunos de ellos, además, capacidad promotora del crecimiento vegetal. La identificación de estos microorganismos constituye

un paso de vital importancia para el estudio de las posibles aplicaciones de los mismos como agentes de control biológico.

## 2.2. OBJETIVOS

- 1.- Identificación y caracterización de aislados con alta capacidad antagonista *in vitro* de patógenos y promotora del crecimiento vegetal de los cultivos hortícolas mediante métodos moleculares basados en la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD-PCR) y la PCR, secuenciando las regiones ITS del ADNr.
- 2.- Evaluación de la capacidad de los metabolitos volátiles y no volátiles producidos por diferentes aislados fúngicos para inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de algunos de los patógenos de mayor importancia en los cultivos:
  - *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* incitante de la fusariosis vascular de la sandía.
  - *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* agente causal del marchitamiento vascular del tomate.
  - *Fusarium solani* productor de podredumbres en el tallo de distintos cultivos.
  - *Phytophthora parasitica* agente causal de la podredumbre de tomate.
  - *Verticillium dahliae* incitante de la verticilosis del olivo.
  - *Didymella bryoniae* productor del chancro gomoso del tallo en melón.
  - *Botrytis cinerea* causante de la podredumbre gris.
  - *Pythium* sp. causante de caídas de plántulas.

# **Revisión bibliográfica**



## 3.1. CONTROL BIOLÓGICO

### 3.1.1. Introducción

La utilización de productos fitosanitarios en el control de enfermedades de plantas es un elemento clave en la agricultura intensiva. Los pesticidas químicos son económicos y actúan rápidamente, a pesar de que la tendencia es la reducción de su aplicación debido a la pérdida de efectividad de los mismos por la aparición de nuevas cepas de patógenos resistentes, a la tendencia del mercado a demandar productos libres de residuos y a que causan un importante daño medioambiental, entre otros factores. A esto hay que unir las restricciones en cuanto al uso de materias activas en la agricultura.

En general, los microorganismos actúan de forma beneficiosa en la planta, y tan sólo una mínima proporción de ellos actúan de forma negativa sobre ésta, causándole enfermedad. En la naturaleza, lo normal es que las plantas estén sanas debido a un mecanismo de autorregulación de poblaciones. A esta autorregulación se le denomina *control biológico* (Mondino y Vero, 2006).

Wilson y Wisniewski (1994) definen el control biológico (CB), indicando que éste no se reduce sólo al empleo de microorganismos, sino que es toda forma de control que no implica el uso de plaguicidas de síntesis química, incluyendo así el uso de sustancias naturales, como son los extractos vegetales, y la inducción de resistencia en las plantas por diferentes mecanismos. Según Van Driesche y Bellows (1996), "el control biológico es el uso de parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población de plagas, haciendo ésta menos abundante y por tanto menos dañina que en ausencia de éstos".

La principal ventaja que poseen los agentes de control biológico (ACB) frente a los agroquímicos es que, debido a su complejo modo de acción, resulta muy improbable la aparición de cepas resistentes del patógeno. Además, suelen ser microorganismos pertenecientes a la flora autóctona, por los que son medioambientalmente compatibles (Rincón, 2004). Por ello, la aplicación de agentes de control biológico puede considerarse como una alternativa o un complemento al control químico (Santos *et al.*, 2008).

El conocimiento de las interacciones entre los propios microorganismos y de éstos con las plantas nos puede permitir diseñar estrategias para frenar o controlar el desarrollo de una enfermedad (Santos et al., 2008).

### **3.1.2. Agentes de control biológico (ACB)**

Existen numerosas referencias bibliográficas donde se expone el uso de bacterias, hongos, levaduras y virus como agentes de control biológico para el control de enfermedades. La selección de aislados que han mostrado antagonismo microbiano, e incluso, han dado lugar a un mayor desarrollo de la planta, ha permitido desarrollar formulados comerciales cuyo ingrediente activo son hongos, levaduras, bacterias o una mezcla de éstos (Santos *et al.*, 2008).

Los agentes de control biológico más estudiados, de los cuales se han desarrollado más formulaciones comerciales, han sido los hongos filamentosos. Entre ellos cabe destacar los casos de *Ampelomyces quisqualis*, hongo micoparásito de oídios, el cual tiene un comportamiento curativo, y distintas especies de *Trichoderma* y *Gliocladium* (Santos y Diáñez, 2010).

La interacción entre los componentes del triángulo de la enfermedad (patógeno-planta susceptible-ambiente favorable) y el propio antagonista suele ser muy específica. Esto tiene su ventaja, ya que el ACB va a actuar de forma inhibitoria frente al patógeno de interés pero, sin embargo, lleva a que cada tipo de formulado comercial sea específico para un determinado patógeno, y habría que diseñar un producto específico para cada patosistema.

Cuando se produce la aplicación de agentes de control biológico se debe tener en cuenta que tipo de microorganismos están presentes de forma natural en la planta. Ello nos permitirá una mayor eficacia en el control de los patógenos (Santos y Diáñez, 2010). La aplicación de productos comerciales se plantea sin tener en cuenta este hecho (Santos y Diáñez, 2010). La utilización de microorganismos aislados de sitios semejantes a donde van a ser aplicados implica una mejor adaptación de los mismos, dando lugar a un biocontrol más eficaz (Santos y Diáñez, 2010).

### 3.1.3. Suelos supresivos

La receptividad de un suelo se define como la capacidad de éste para permitir que un agente fitopatógeno se instale, desarrolle, conserve y exprese su capacidad patogénica sobre una planta susceptible (Alabouvette *et al.*, 1993). El término suelo o sustrato supresivo se aplica a aquéllos en los que las enfermedades causadas por determinados patógenos no se manifiestan o lo hacen mínimamente, a pesar de que los fitopatógenos están naturalmente presentes o artificialmente introducidos, de cultivar un huésped susceptible y de que el ambiente aéreo sea favorable (Baker y Cook, 1974; Schroth y Hanncock, 1981). Dado que el término supresividad es opuesto al de receptividad, podemos definirlo también como la capacidad de éste para no permitir que un agente fitopatógeno se instale, desarrolle, conserve y exprese su capacidad patogénica sobre una planta susceptible (Diáñez, 2005).

En los ecosistemas naturales, la existencia de supresividad a enfermedades en los suelos no es algo excepcional como generalmente sucede en los sistemas agrícolas, sino que es la enfermedad la que constituye una excepción cuando se respeta y mantiene la biodiversidad y fertilidad natural de los suelos (Diáñez, 2005).

La detección del fenómeno de supresividad en los suelos ocurre cuando la incidencia o la severidad de una enfermedad es menor de la esperada para las condiciones ambientales existentes (Cook y Baker, 1983). Para la medida de la supresividad es importante aislar el efecto suelo de otras posibles fuentes de variación tales como la densidad de inóculo, el cultivar, las condiciones climáticas o el manejo cultural (Couteaudier *et al.*, 1987; Rouxel *et al.*, 1991).

Un ejemplo clásico de supresividad natural en los suelos es la supresividad frente los marchitamientos vasculares producidos por *Fusarium oxysporum*. Este fenómeno fue por primera vez reconocido en el siglo XIX por en cultivos de algodón (Atkinson, 1892; Weller *et al.*, 2002) y fue posteriormente descrito para otros muchos suelos y cultivos en todo el mundo (Smith y Zinder, 1971; Toussoun, 1975; Scher y Baker, 1980; Alabouvette, 1986; Hopkins *et al.*, 1987; Sneh *et al.*, 1987; Peng *et al.*, 1999; Domínguez *et al.*, 2002). La supresividad a marchiteces vasculares producidas por *F. oxysporum* en estos suelos limita o reduce la severidad de la enfermedad en muchas

especies vegetales (Cook y Baker, 1983; Alabouvette, 1990). Esta supresividad es generalmente de origen natural, aunque puede ser en algunos casos inducida mediante prácticas culturales como el monocultivo de melón y de sandía (Sneh *et al.*, 1984; Larkin *et al.*, 1993). La naturaleza de la supresividad en estos suelos es microbiológica, ya que la supresividad en los mismos se pierde cuando son sometidos a tratamientos con calor húmedo, bromuro de metilo o radiaciones gamma (Alabouvette *et al.*, 1977; Scher y Baker, 1980; Alabouvette, 1986) y se restablece cuando se mezcla un suelo conductivo previamente esterilizado con calor, con una pequeña parte del suelo original supresivo (Scher y Baker, 1980; Alabouvette, 1986).

La supresividad a enfermedades puede lograrse mediante la manipulación del ambiente físico-químico y microbiológico, utilizando prácticas culturales como el empleo de enmiendas en el suelo, rotaciones de cultivos o solarización (Whipps, 2000). También puede inducirse por inoculación o introducción de determinados antagonistas a los suelos o sustratos (Baker y Chet, 1982; Lewis y Papavizas, 1991; Becker y Shwinn, 1993; Campbell, 1994).

### **3.1.4. Mecanismos de control biológico**

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico (Fernández-Larrea, 2001). Si el antagonista posee varios mecanismos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno y aumenta su eficacia como ACB.

El control biológico de enfermedades, realizado por los microorganismos antagonistas, se produce mediante distintos mecanismos de acción que generalmente se dan de forma simultánea. Entre los modos de acción descritos se encuentran: la inhibición del patógeno por compuestos antimicrobianos, denominada antibiosis; la competencia por el hierro mediante la producción de sideróforos; la competencia por el espacio y los nutrientes suministrados por semillas y raíces; la inducción de mecanismos de resistencia de las plantas; la inactivación de los factores de germinación de los patógenos presentes en los exudados de las semillas y raíces; la degradación de factores de

patogenicidad de los patógenos, tales como toxinas; el parasitismo que entraña la producción de enzimas extracelulares, como quitinasas o  $\beta$ -1,3-glucanasas, que degradan y rompen las paredes celulares de los patógenos (Keel y D efago, 1997; Whipps, 1997).

#### **3.1.4.1. Competencia por los recursos**

La competencia es la lucha de dos o m as organismos por ocupar un sustrato que no es suficiente para todos ellos (Baker y Cook, 1974). Esto implica un enfrentamiento por el espacio, agua y nutrientes existentes en el suelo o sustrato. Este tipo de antagonismo se ve determinado por las características del ACB, como: plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo; y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Ahmad y Baker, 1987; Hjeljord *et al.*, 1998). Una alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la capacidad de crecer sobre una amplia gama de sustratos son algunas de las características más importantes a la hora de seleccionar un determinado microorganismo como ACB.

#### **3.1.4.2. Micoparasitismo**

El micoparasitismo es la acción directa de un microorganismo parasitando a otro. Esto consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. La relación de parasitismo hongo-hongo fitopatógeno se produce sobre esporas, esclerocios, hifas y otras estructuras fúngicas (Whipps, 2000). Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas,  $\beta$ -1,3-glucanasas y proteasas, que rompen las estructuras de los hongos parasitados.

Los ejemplos más conocidos de hongos hiperpar sitos son *Trichoderma* y *Gliocladium*. Ambos ejercen su acción mediante varios mecanismos, entre los cuales tiene un rol importante el parasitismo. Los hongos del género *Trichoderma* han sido muy estudiados como antagonistas de patógenos de suelos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum* (Carballo *et al.*, 2004). Las especies de *Trichoderma* crecen quimiotr picamente hacia el hospedante durante el proceso de micoparasitismo, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones (Infante *et al.*, 2009).

### 3.1.4.3. Antibiosis

La producción de antibióticos ha sido extensamente demostrada como mecanismo de control biológico utilizado por los agentes de control biológico (ACB) frente a los fitopatógenos telúricos (Sharma, 2004). La antibiosis se define como un antagonismo mediado por metabolitos específicos o no específicos, agentes líticos, enzimas, compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas (Sharma, 2004). La producción de éstos parece ser importante para la supervivencia de los microorganismos debido a la eliminación de competencia microbiana para las fuentes de alimento, las cuales son generalmente muy limitadas en el suelo (Ellis *et al.*, 2000; Slattery *et al.*, 2001). Esta capacidad provee a los organismos de un margen competitivo, especialmente en la colonización de sustratos orgánicos (Carballo *et al.*, 2004).

La mayoría de microorganismos antagonistas producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no entran en contacto físico. Las sustancias antibióticas pueden reducir o prevenir la germinación de propágulos, provocar la lisis o inhibir el crecimiento del micelio de otros hongos (Garret y Robinson, 1969; Papavizas y Lumsden, 1980). Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y haciéndolo más sensible a los antibióticos no volátiles (Infante, 2009). Los sideróforos, metabolitos de bajo peso molecular, tienen la capacidad de quelatar el hierro insoluble del medio.

Una ventaja de la antibiosis es que no es necesario que el patógeno y el antagonista entren en contacto y, además, el antibiótico puede permanecer en el medio tras la muerte del antagonista (Cook y Baker, 1983).

### 3.1.5. *Trichoderma* y *Paecilomyces* en la agricultura

#### 3.1.5.1. *Trichoderma* sp.



Foto n° 1. Crecimiento *in vitro* de uno de los aislados del género *Trichoderma*.

Los hongos del género *Trichoderma* han sido ampliamente estudiados como promotores del crecimiento de plantas, como agentes del control biológico de enfermedades aéreas y como agentes de control de patógenos de suelo.

Las características ecológicas de los hongos pertenecientes a este género los hacen especialmente adecuados para su aplicación como ACB de enfermedades producidas por hongos. Las especies de *Trichoderma* son ubicuas, se hallan ampliamente distribuidas tanto geográficamente como en distintos tipos de suelo, siendo predominantes en hábitats donde abundan restos vegetales y madera en descomposición. Son hongos saprofitos, con la excepción de algunas especies que además son micoparásitas. Poseen una gran capacidad de colonización de distintos ambientes debido a que crecen muy rápidamente, tienen pocos requerimientos nutricionales y sobreviven en condiciones muy adversas (Papavizas, 1985).

Una de las características más interesantes de las poblaciones de *Trichoderma* es que tienen unas capacidades metabólicas muy diversas. Las especies de este género son capaces de transformar una amplia variedad de materia orgánica de origen natural y xenobiótico mediante la producción de gran cantidad de enzimas extracelulares que degradan distintos tipos de polímeros, entre ellos polisacáridos como la celulosa, la quitina, la laminarina, la pectina, el almidón y el xilano. Esto los convierte en microorganismos de

gran interés biotecnológico (Buchert *et al.*, 1998; Galante *et al.*, 1998) y medioambiental (Espósito y da Silva, 1998).

*Trichoderma* coloniza las raíces de las plantas favoreciendo el desarrollo tanto aéreo como radicular e impide el ataque de fitopatógenos telúricos (Santos y Diáñez, 2010). Además, esta colonización radical genera resistencia sistémica controlando a su vez ciertos patógenos aéreos (Yedidia *et al.*, 2003). Otros trabajos demuestran la capacidad del hongo para destruir estructuras de resistencia y propagación de hongos fitopatógenos, como son los esclerocios de *Sclerotinia cepivorum* por *T. viride* (Clarkson *et al.*, 2002). También ha sido empleada como recubrimiento de semilla, evitando la caída de plántulas (Ezziyyani *et al.*, 2004), así como inóculo para diversos sustratos, reduciendo las enfermedades producidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Rhizoctonia solani*. (Tello *et al.*, 2003).

Como ACB de enfermedades aéreas, se ha descrito frente a *Botrytis cinerea* en vid (Elad, 2000; Santos y Diáñez, 2010), *Cladosporium fulvum* en tomate (Elad, 2000; Santos y Diáñez, 2010) o la fusariosis del trigo (Pereyra *et al.*, 2005).

*Trichoderma* ha demostrado ejercer un efecto promotor sobre el crecimiento vegetal. Esto podría estar provocado por la capacidad de *Trichoderma* de solubilizar metales, como el zinc, el manganeso, el hierro o el cobre, convirtiéndolos así en nutrientes asimilables por las plantas (Altomare *et al.*, 1999). Otro efecto indirecto podría ser la eliminación de la rizosfera de patógenos de menor incidencia, como es el caso de *Pythium*, sin los cuales las plantas alcanzarían su máximo potencial de desarrollo (Harman *et al.*, 1989). Aún así, en experimentos de laboratorio en los que sólo están presentes *Trichoderma* y la planta a ensayar, también se produce el estímulo del crecimiento. Existen evidencias de que hay factores difusibles, aún no identificados, que intervienen en el desencadenamiento de la respuesta de la planta, dado que experimentos en los que los dos organismos, planta y hongo, se separan mediante una membrana de celofán dan resultados similares (Windham *et al.*, 1986). Una hipótesis más reciente propone que *Trichoderma* es capaz de limitar e incluso revertir el efecto del daño oxidativo en la raíz (Björkman *et al.*, 1998).



Existen estudios que demuestran que numerosas especies de este género exuda multitud de enzimas líticas, como  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas, proteasas, xilanasas, galactosidasas, pectinasas, etc. Estas enzimas están implicadas tanto en la hidrólisis de paredes celulares como en la desactivación de enzimas hidrolíticas del fitopatógeno siendo esenciales en el micoparasitismo de fitopatógenos (López-Mondéjar *et al.*, 2011).

*Trichoderma* produce una amplia gama de metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles con capacidad antagonista sobre diversos microorganismos, como: la gliotoxina, un metabolito con capacidad fungistática implicado en el antagonismo frente a *Rhizoctonia* (Weindling, 1934); la gliovirina, otro compuesto con fuertes propiedades antimicrobianas, especialmente contra Oomycetos (Howell *et al.*, 1993); la trichodermina, un potente inhibidor de la actividad peptidil transferasa, necesaria para la elongación y/o terminación de las proteínas (Wei *et al.*, 1974); el ácido harziánico, que muestra actividad antibiótica contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani* (Vinale *et al.*, 2009); y otros como la tricholina, la viridina, etc. Las trichorzianinas son antibióticos que forman canales iónicos en la membrana celular y modifican la permeabilidad (Kubicek *et al.*, 1994, Kubicek *et al.*, 1996). *T. harzianum* produce varios tipos de trichorzianinas durante el antagonismo de *B. cinerea* cuya función es inhibir la germinación de esporas fúngicas. A su vez, se sabe que existe cierto sinergismo entre las trichorzianinas, quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas producidas por el hongo (Kubicek *et al.*, 1994).

Bajo condiciones *in vitro*, se ha observado que los compuestos antibióticos volátiles producidos por *T. virens* provocan una inhibición del 39% en el crecimiento de *Macrophomina phaseolina* (Maheshwari *et al.*, 2001).

El olor a coco característico de ciertos aislados de *Trichoderma* proviene de una sustancia llamada 6-pentil- $\alpha$ -pirona, un compuesto volátil con buenas perspectivas para su uso en el biocontrol (Reithner *et al.*, 2005, 2007; Vinale *et al.*, 2008). Este compuesto ha demostrado tener actividad antifúngica y promotora del crecimiento vegetal.

### 3.1.5.2. *Paecilomyces* sp.



Foto n° 2. Crecimiento *in vitro* de uno de los aislados del género *Paecilomyces*.

*Paecilomyces* es un hongo filamentoso ampliamente distribuido en el suelo en la mayoría de países del mundo, incluido España (Padilla, 2003). Las especies del género *Paecilomyces* habitan una amplia gama de hábitats, incluyendo el suelo, plantas caídas, restos de comida, etc. Algunas especies tienen la peculiaridad de ser termófilas, pudiendo sobrevivir a temperaturas que rondan los 60 °C. (Sutton, 1998). Gracias a su velocidad de crecimiento y alta esporulación, *Paecilomyces* actúa como un buen colonizador y competidor de rizosfera (Chen *et al.*, 2000). Diversas especies de este género han sido estudiadas como agentes de control biológico, principalmente como entomopatógeno.

*Paecilomyces* ha sido observado sobre un amplio rango de hospedadores, pertenecientes a numerosos órdenes de insectos. Se ha encontrado sobre lepidópteros, en larvas de *Spodoptera littoralis* (Fargues *et al.*, 1980), *Spodoptera frugiperda* (Lezama-Gutierrez *et al.*, 1994) y *Lyriomiza trifolii* (Bordat *et al.*, 1988; Riba *et al.*, 1989). Sobre coleópteros se informa su efecto ovicida contra *Diabrotica speciosa* (Tigano-Milani *et al.*, 1995). También se ha podido observar sobre dípteros como *Musca domestica* (Bordat *et al.*, 1988); en homópteros, tales como *Bemisia tabaci* (Smith, 1993; Huang *et al.*, 2010) y *Trialeurodes vaporariorum* (Poprawski *et al.*, 2000); y en isópteros, contra algunas especies de termitas (Wright *et al.*, 2003).

Se ha demostrado la eficacia de *Paecilomyces* como entomopatógeno de nemátodos. Estudios realizados por Lara-Martes *et al.* (1996) demuestran que *Paecilomyces* no sólo reduce las poblaciones de *Meloidogyne* sp., sino que parasita los huevos del nemátodo, disminuye la nodulación e incrementa los rendimientos y beneficios

del cultivo. También se ha observado como antagonista de *Radopholus similis*, nemátodo que ataca las raíces de los cítricos (Kilama *et al.*, 2007).

Estudios recientes confirman la capacidad de *Paecilomyces* como ACB frente a enfermedades fúngicas. Fang *et al.* (2005, 2006) han estudiado el efecto antagonista de *P. lilacinus* y su mecanismo frente a *Fusarium oxysporum*, encontrando que los metabolitos secundarios producidos por el hongo suprimen el crecimiento, esporulación y germinación de *F. oxysporum*. *P. lilacinus* es utilizado como ACB de hongos fitopatógenos como *Macrophomina phaseolina* y *Sclerotium cepivorum* (CAB, 2004). Se ha reportado también el biocontrol de *Pythium ultimum* por parte de *P. variotii* (Bocourt, 2009).

Se ha demostrado que *Paecilomyces* produce metabolitos volátiles, como alcoholes, cetonas, éteres y compuestos terpenoides (Sunesson *et al.*, 1995). También se ha reportado la producción de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico. Otro compuesto importante producido es el ácido 2,6-piridindicarboxílico o ácido dipicolínico, que posee propiedades insecticidas (Pucheta *et al.*, 2006). También se han encontrado toxinas peptídicas lineales y cíclicas, como la beauvericina y las leucinostinas (Asaff, 2006), y no peptídicas, como la paecilomicina (Khachatourians, 1996). Horn *et al.* (1993) identificaron dos ácidos eicosenoicos con actividad fungicida en el caldo de cultivo de *P. variotii*. La farinomaleina, extraído de *P. farinosus*, ha mostrado ser un potente inhibidor frente a *Phytophthora sojae* (Putri *et al.*, 2010).

## **3.2. USO DE ANÁLISIS MOLECULARES EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS**

La caracterización de las distintas especies fúngicas ha estado basada principalmente en criterios como el tamaño de las conidias, el color y la forma, el patrón y la frecuencia de ramificación del micelio y otras características morfológicas que no son muy fiables (Maymon *et al.*, 2004). En la actualidad, los métodos de caracterización genotípica se han convertido en técnicas tremendamente rápidas y sencillas, siendo una herramienta indispensable para la detección e identificación de microorganismos fitopatógenos. Las técnicas moleculares nos permiten adentrarnos en la complejidad y variabilidad del contenido genético de los organismos.

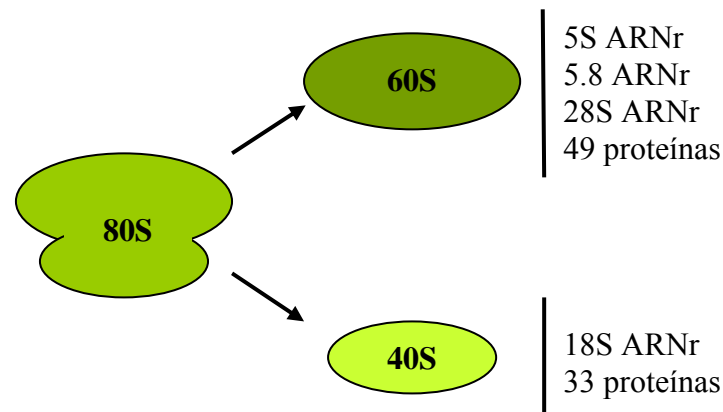
### **3.2.1. ARN ribosomal y secuencias ITS**

El estudio comparativo de las secuencias de nucleótidos del ARN ribosomal (ARNr) proporciona un medio para el análisis de las relaciones filogenéticas en un rango amplio de niveles taxonómicos (Woese y Olsen, 1986; Jorgensen y Cluster, 1989). Los ribosomas son estructuras celulares compuestas de ARN (ARNr) y proteínas ribosómicas, conocidas como ribonucleoproteínas. En los ribosomas se lleva a cabo la traducción de los ARN mensajeros (ARNm) a una cadena polipeptídica, una proteína que es el producto final de la expresión de un gen estructural. Su estructura, tanto en organismos procariontes como eucariontes, es similar y su tamaño se mide en unidades S (Svedberg), que corresponde a las medidas de sedimentación de las partículas en una centrífuga.

Los eucariontes tienen ribosomas de 80S con una subunidad de 40S y otra de 60S. La subunidad menor consta de 33 proteínas y una molécula de 18S ARNr. La subunidad mayor consta de 49 proteínas y 3 tipos de moléculas de ARNr: 5S ARNr, 5.8S ARNr y 28S ARNr (Figura nº 1).

La región de ADN donde se encuentran los genes que codifican los ARNr es conocida como ADNr. En hongos filamentosos y levaduras, el ADNr está organizado como una unidad que se repite una detrás de la otra (en tándem). Cada unidad incluye tres genes: el gen que codifica para el 18S ARNr, el gen para 5.8S ARNr y el gen para

28S ARNr. Además, en cada unidad, los genes están separados por dos secuencias espaciadoras internas que se transcriben junto a los genes de ARNr, denominadas ITS1 e ITS2 (Figura nº 2). Estas secuencias son conocidas como secuencias ITS, Internal Transcribed Spacer, es decir, espaciadores de transcripción interna, y aunque son transcritas, no son codificantes. Además, cada unidad de ADNr se encuentra separada por un espaciador intergénico, IGS (Inter Genic Spacer). El gen más pequeño, 5S ARNr, puede o no estar incluido en la unidad de ADNr, dependiendo del grupo taxonómico que se esté analizando.



**Figura nº 1.** Estructura de un ribosoma eucarionte.

Cuando se transcribe el ADNr que codifica los genes para cada uno de los ARNr que forman los ribosomas eucariontes, las regiones espaciadoras, no codificantes, quedan representadas en este transcrito primario, por lo que estas secuencias son removidas por un mecanismo específico de procesamiento del ARN ribosómico y sólo después de estas modificaciones pasan a formar parte del ribosoma.

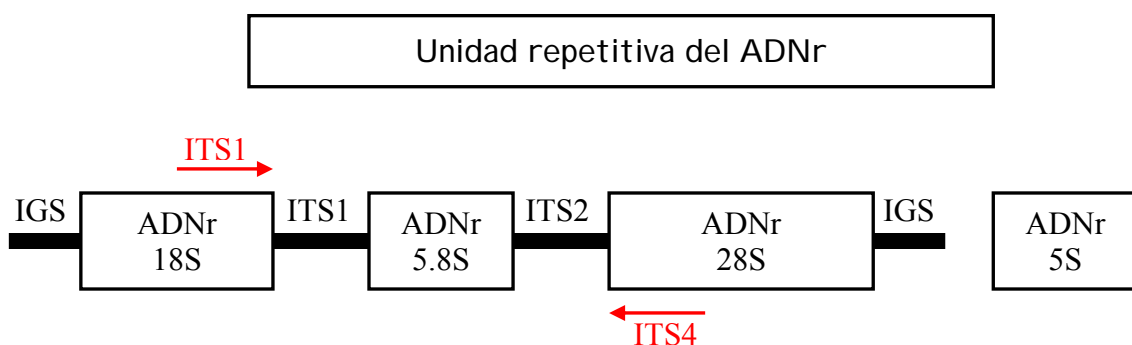
Debido a que el cambio en las secuencias de los genes de ARNr es muy lento, la comparación de éstas puede ser utilizada para estudiar la evolución entre organismos distantemente relacionados, mientras que las regiones no codificantes, ITS e IGS, cambian rápidamente y son útiles para la comparación de especies dentro de un género. Por este motivo, las regiones espaciadoras de transcripción internas, ITS, de los ARN ribosómicos surgen como un concepto de la Biología Molecular para la tipificación genética de microorganismos.

Como se indicaba anteriormente, las secuencias que constituyen los espaciadores ITS están codificados por los ADN ribosómicos (ADNr). Todos los organismos eucariontes tienen dos regiones ITS (Figura nº 2):

- ITS1: ubicado entre el gen que codifica por el ARNr de 18S y el gen que codifica al ARNr de 5.8S.
- ITS2: que se ubica entre los genes de los ARNr ribosómicos de 5.8S y 28S.

Las secuencias de los espaciadores de transcripción interna (ITS) se han utilizado para generar cebadores específicos capaces de diferenciar especies de hongos estrechamente relacionados (Bryan *et al.*, 1995). Los cebadores o “primers” son una pareja de oligonucleótidos cuyas secuencias son complementarias a cada uno de los extremos 3’ del fragmento de ADN que se desea amplificar. La distancia entre ellos determinará la longitud de la secuencia de ADN amplificada. Los cebadores son necesarios para iniciar la síntesis de ADN *in vitro* mediante la técnica conocida como PCR o reacción en cadena de la polimerasa.

Haciendo uso de dos cebadores o “primers” específicos, llamados ITS1 e ITS4 (marcados en color rojo en la Figura nº 2) se puede amplificar la región que incluye a ITS1, 5.8S ADNr e ITS2, la cual varía en longitud, dependiendo de la especie.



**Figura nº 2.** Localización de los cebadores ITS1 e ITS4 en el ADNr nuclear y mitocondrial.

### 3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Hasta 1985 el único método que existía para obtener grandes cantidades de un fragmento de ADN era clonándolo en vectores y multiplicándolo en bacterias. Ese año, el investigador norteamericano Kary Mullis desarrolló un método que permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN *in vitro* a partir de una pequeña muestra de ADN, aunque requiere conocer la secuencia de nucleótidos de los extremos del fragmento que se desea amplificar.

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica usada para crear un gran número de copias de un fragmento de ADN, siendo un método muy simple para la ampliación de ácidos nucleicos (Mullis y Faloona, 1987). Estudios recientes recurren a métodos moleculares basados en la técnica de la PCR por su alta fiabilidad en la identificación de especies (Maymon *et al.*, 2004).

Partiendo de una molécula de “ADN diana” podemos amplificar una secuencia específica contenida en ella, mediante la utilización de unos oligonucleótidos o cebadores diseñados para éste fin. Es necesario conocer de antemano la secuencia de nucleótidos del genoma de los organismos que se desean estudiar, ya que se requiere diseñar y sintetizar los cebadores.

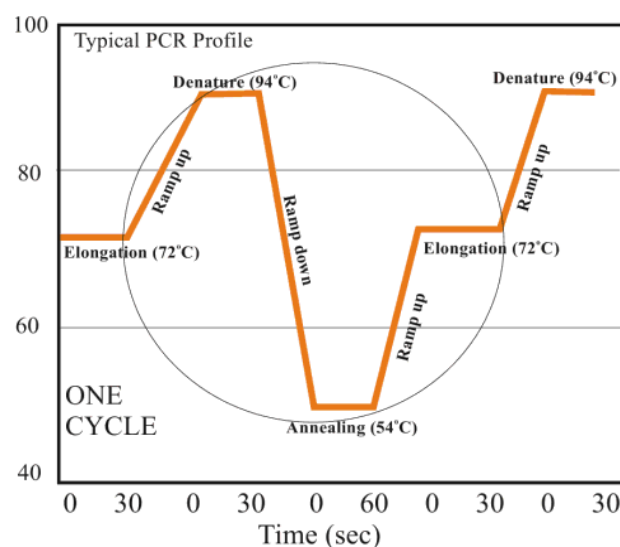
Para realizar la reacción de amplificación se ha de preparar una mezcla de reacción, la cual debe estar constituida por:

- La muestra de ADN del organismo a analizar.
- Los cebadores sintéticos correspondientes a la región que se desea amplificar.
- Los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato: dATP (desoxiadenosina trifosfato), dGTP (desoxiguanina trifosfato), dCTP (desoxicitosina trifosfato) y dTTP (desoxitimina trifosfato).
- La enzima ADN polimerasa.

Esta mezcla de reacción, gracias a un termociclador, se somete a ciclos de temperatura sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización,

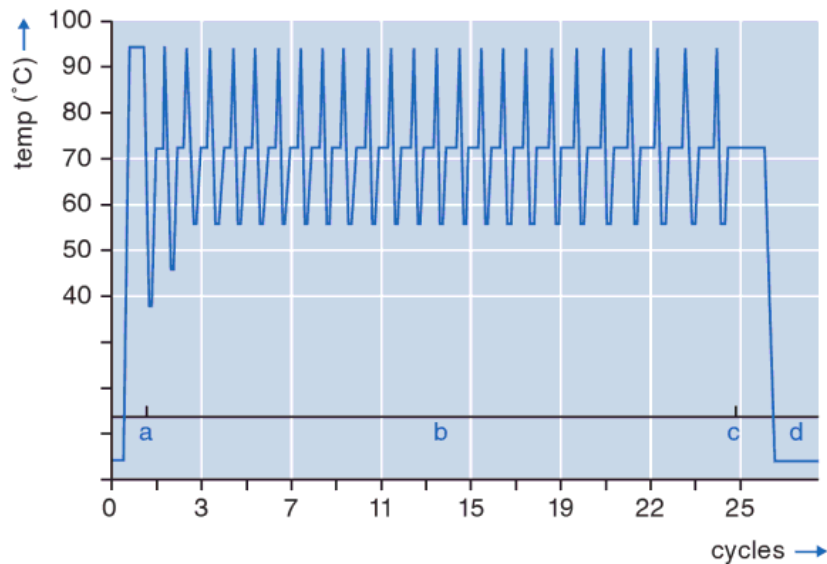
hibridación o apareamiento con cebadores y elongación o extensión por una ADN polimerasa termorresistente (Figura nº 3).

- **Desnaturalización:** Las dos cadenas de ADN utilizadas como diana son separadas mediante la incubación a una temperatura elevada (92-96°C) dependiendo de su contenido en G+C. Las hebras disociadas permanecerán en esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la hibridación de los cebadores.
- **Hibridación:** A una temperatura de unos 50-60 °C se produce la hibridación de los dos cebadores diseñados con las secuencias de ADN que limitan físicamente con la región que se pretende amplificar.
- **Elongación:** El tercer paso consiste en la elongación de los cebadores por la acción de la ADN polimerasa. A una temperatura de 70-74 °C, esta enzima realiza la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el sentido 5' – 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena, creada gracias a los cebadores. El resultado del proceso es la formación de unas cadenas de ADN copiadas de las moléculas diana y que han incorporado en el extremo 5' de su secuencia la del respectivo cebador. La enzima ADN polimerasa utilizada comúnmente es la purificada a partir de un microorganismo termófilo, *Thermus aquaticus*, llamada Taq polimerasa (Saiki *et al.*, 1988).



**Figura nº 3.** Variación de temperatura para un solo ciclo de PCR.  
**Fuente:** Viljoen G., Nel L., Crowther J. (2005). Molecular diagnostic PCR handbook. Ed. Springer, Netherlands.





**Figura n°4 .** Variaciones de temperatura a lo largo de toda la amplificación.  
**Fuente:** Pelt-Verkuil E. can Belkum A. Hays J. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. Ed. Springer, Netherlands.

Cada conjunto de estos tres pasos (desnaturalización, hibridación y elongación) constituye un ciclo. Tras cada ciclo, el número de fragmentos de ADN formados es el doble de los presentes en el ciclo anterior. A partir del tercer ciclo se empieza a acumular el producto de interés, delimitado por los extremos 5' de los cebadores. A medida que aumenta el número de ciclos, este producto pasa a ser la molécula diana a la cual se unirán preferentemente las moléculas de cebador presente en la mezcla, conduciendo a una acumulación teóricamente exponencial del producto.

La separación de los productos obtenidos en la PCR se efectúa mediante electroforesis siguiendo el método descrito por Sambrook *et al.*, (1989), pudiendo utilizar para ello distintos tipos de geles, normalmente agarosa. Dependiendo del tamaño de amplificación y la resolución que deseemos, se podrán utilizar diferentes medios a diferentes concentraciones.

La posterior visualización se realiza tiñendo el gel con una solución de bromuro de etidio, el cual emite una luz anaranjada al ser iluminado con luz ultravioleta, la cual es captada por un captador de geles y representada en una pantalla.

### **3.2.3. Amplificación al azar de ADN polimórfico mediante PCR (RAPD-PCR)**

La técnica RAPD-PCR es un método molecular que ha demostrado ser una poderosa herramienta en la diferenciación de especies o subespecies, en el estudio de la diversidad genética de cepas o poblaciones dentro de una misma especie, en la construcción de mapas genéticos, en el mapeo de caracteres en poblaciones segregantes, etc. Esta técnica permite la detección de polimorfismos en organismos altamente relacionados, el cual resulta de diferencias en las secuencias que interfieren en la amplificación. Estas diferencias hacen que se amplifiquen fragmentos para un individuo o cepa pero no para otro (Micheli y Bova, 1997).

Las diferencias a nivel de ADN entre individuos pueden deberse a:

- Cambio de nucleótidos en el sitio de unión del iniciador que impide la amplificación.
- Inserciones que aumentan demasiado la distancia entre los sitios de unión de los iniciadores como para permitir la amplificación.
- Inserciones o deleciones que cambian el tamaño del fragmento amplificado.

La amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN (RAPD-PCR) se basa en una amplificación mediante PCR en condiciones de baja astringencia y utilizando cebadores de secuencia arbitrarios de pequeño tamaño, generalmente de 8-10 pb, de tal forma que por simple cuestión de probabilidad los cebadores hibridan de manera inespecífica y aleatoria con diferentes fragmentos del genoma complementarios a su secuencia, obteniéndose un determinado número de amplificaciones de distinto tamaño para cada cepa (Prats, 2005). Con esta técnica no se busca ningún fragmento de ADN en particular, ya que se utilizan iniciadores de secuencia aleatoria.

En comparación con otras técnicas, la RAPD-PCR ofrece varias ventajas como: ser un procedimiento relativamente barato; una combinación de un protocolo rápido, simple y seguro, al no requerir sustancias radioactivas; la posibilidad de utilizar un número ilimitado de cebadores; unos mínimos requerimientos de ADN; la innecesidad del conocimiento

previo de la secuencia a amplificar; ser un rápido proceso para visualizar un amplio número de fragmentos simultáneamente (Walker y Rapley, 2008).

El principal inconveniente de la RAPD-PCR es que las secuencias de los fragmentos de ADN amplificados son desconocidas, ya que los cebadores utilizados no hibridan directamente con ningún locus en particular. Además, debido al uso de primers de secuencia aleatoria se requieren precauciones extremas para minimizar la contaminación de las muestras (Walker y Rapley, 2008).

### 3.3. PATÓGENOS DE IMPORTANCIA EN LOS PRINCIPALES CULTIVOS HORTÍCOLAS

#### 3.3.1. *Fusarium oxysporum*

Es la especie más importante del género *Fusarium* desde el punto de vista fitopatológico. En ella, se incluyen la mayoría de las especializaciones que originan las denominadas traqueofusariosis. Pero no quedan en ellas limitadas sus habilidades parasitarias, y así, las hay capaces de producir podredumbres radiculares del cuello y de la base del tallo, o, simplemente, las que originan pequeñas necrosis o podredumbres limitadas en el sistema radicular de algunas plantas, y que los autores han ideado incluir en lo que se denomina la “fatiga del suelo” (Tello y Lacasa, 1990).

Citando a Messiaen y Cassini, (1968), Tello y Lacasa, (1990) tratan de esta forma, la delimitación de las múltiples formas especializadas (f. sp) de *Fusarium oxysporum*: “La mayor parte de los autores que han descrito formas especializadas o razas de *F. oxysporum*, definen la forma especializada como el conjunto de cepas, que atacan a una especie vegetal, o a lo sumo varias especies de un mismo género”.

##### 3.3.1.1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

Este hongo es el agente causal de la Fusariosis vascular del tomate. Es una enfermedad de importancia mundial que causa grandes pérdidas en el cultivo de tomate

La enfermedad es más frecuente en suelos ácidos, mal drenados y de textura arenosa. *Fol* sobrevive en los restos de cosecha o como clamidiosporas en el suelo, donde puede llegar a perdurar varios años.

Los síntomas pueden expresarse tanto en plántulas como en plantas adultas. Las plántulas infectadas alcanzan escaso desarrollo. Las hojas se vuelven flácidas y desarrollan epinastía, pudiendo algunas amarillear. Posteriormente se ensancha la base de los tallos afectados y, normalmente, las plantas se marchitan y mueren. En plantas adultas el síntoma inicial es el amarilleamiento de las hojas más viejas. Dichos síntomas suelen afectar sólo a un sector de la planta, y con frecuencia los folíolos a un lado del peciolo se vuelven

amarillos antes que los del otro lado. Esta amarillez afecta de forma gradual a la mayor parte del follaje, síntoma que va acompañado por la marchitez de la planta durante las horas más cálidas del día. Día a día, la marchitez se va extendiendo hasta que la planta colapsa y muere. El tejido vascular de la planta enferma suele ser de coloración marrón. Esta coloración se extiende hacia el extremo apical del tallo y es especialmente notable en la inserción del peciolo al tallo. La infección del fruto ocurre de forma ocasional y esto puede detectarse mediante la existencia de coloración en el tejido vascular del fruto (Jones, 2006).

### **3.3.1.2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon)**

La primera evidencia de la Fusariosis vascular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon) en el cultivo de sandía se dio en Georgia y Carolina del Sur en 1894. En la actualidad se ha establecido a lo largo de todas las regiones de los cinco continentes.

Reside en el suelo y entra a través de pequeñas raíces, picaduras de nematodos, así como otras lesiones o aberturas. Una vez en el interior, avanza a través del xilema causando las podredumbres vasculares. Los síntomas principales de la enfermedad se caracterizan por una marchitez que se inicia en las hojas de la base y que se puede manifestar de forma unilateral o únicamente en algunos tallos de la planta. Sobre tallos se aprecia un flujo pegajoso y una acumulación de goma en el interior.

*Fon* esta subdividido en razas. Originalmente se describen dos razas, la raza 0 y 1. Raza 0 no causa marchitez en cultivares resistentes, mientras que la raza 1 causa leve a moderada marchitez en la mayoría de los cultivares que están clasificados como resistente a la marchitez de *Fusarium*. Existe otra raza reconocida como raza 2, que es de una agresividad muy alta y causa grave marchitez en todos los cultivares conocidos. (Fuente: [www.extento.com](http://www.extento.com)).

### **3.3.2. *Fusarium solani* (Fs)**

*F. solani* es un hongo no vascular no especializado. Provoca podredumbres en el cuello de ciertas plantas y de los frutos que descansan sobre el suelo o próximos a él, (Messiaen *et al*, 1995).

Los principales cultivos a los que afecta este hongo son:

- Cucurbitáceas, causado por *F. solani* f. sp. *cucurbitae*. La vida de las clamidosporas en el suelo no superan los tres años. Los ataques se manifiestan en forma de lesión parda próxima al nivel del suelo, que pueden alcanzar partes aéreas en tiempos húmedos. La podredumbre se extiende tanto a la corteza como al cilindro central, provocando la muerte de la planta, que permanecen fijas al suelo por las fibras leñosas que quedan intactas (Messiaen, 1995). Los frutos que se hallan en contacto con el suelo, pueden ser afectados con lesiones circulares pardas. El micelio puede alcanzar el interior del fruto y contaminar a las semillas. Así, compensa su débil permanencia en el suelo, diseminándose a través de las semillas (Messiaen, 1995).

- Judías, cuyo agente causal es *F. solani* f. sp. *phaseoli*. Es uno de los hongos más extendidos por todo el mundo que actúa como principal agente de la necrosis de las raíces de las judías (*Phaseolus vulgaris*). Provoca necrosis rojizas que se extiende hasta el hipocótilo. En las producciones de judías verdes, las necrosis de las raíces reducen el vigor y producen mermas en el rendimiento, provocando una senescencia de las hojas viejas (Messiaen 1995).

- Guisante, causado por *F. solani* f. sp. *pisi*. Estas necrosis debilitan la planta provocando una disminución en el número de vainas y relleno de las mismas. Es el parásito más frecuente en Europa y Estados Unidos (Messiaen, 1995).

### **3.3.3. *Pythium* sp. (Py)**

Una de las características más relevantes de la especie *Pythium* sp. es su reducida especificidad parasitaria, siendo capaz de atacar un gran número de especies vegetales. Esta capacidad facilita su multiplicación y conservación en el medio. *Pythium* sp. es, fundamentalmente, productor de ahogamiento de las plántulas en las fases de preemergencia y postemergencia, variando éstas con la edad y la etapa de desarrollo de la planta afectada (Messiaen, 1995).

Cuando las semillas de las plantas susceptibles se siembran en suelos infectados y son atacados por el patógeno, éstas se ablandan, adquiere tonalidades pardas, se arrugan y

se desintegran. Los únicos síntomas de la enfermedad durante las etapas iniciales de germinación, consiste en una reducida emergencia de plántulas (Messiaen, 1995).

La reducida emergencia de plántulas también puede ser consecuencia de las infecciones que produce el hongo sobre las plántulas después de la germinación, pero antes de que las plántulas hallan emergido del suelo. La infección inicial toma apariencia de una mancha húmeda ligeramente ennegrecida. La zona infectada se extiende con rapidez, la planta es invadida por el hongo y muere poco después del inicio de la infección. Los daños descritos se producen cuando las plántulas todavía no han emergido (Messiaen, 1995).

Cuando las plántulas ya han emergido, casi siempre son atacadas a nivel de raíces y de cuello. El hongo penetra fácilmente por los tejidos suculentos, adquiriendo las zonas invadidas un aspecto acuoso y decolorado. Como consecuencia de ello, la planta pierde firmeza y capacidad de soporte de las partes aéreas, dando como resultado que la plántula caiga al suelo. El hongo continuará invadiendo la planta hasta producir su marchitamiento y muerte (Messiaen, 1995).

Los síntomas mostrados son generalmente menor crecimiento de las plantas, marchitamiento de las hojas, necrosis con o sin podredumbre de la base del tallo, necrosis del sistema radicular y muerte de las plantas (Messiaen y Lafon, 1970; Blancard *et al.*, 1991).

Generalmente, las infecciones a plantas adultas se limitan a pequeñas raíces que son dañadas y destruidas por el hongo. Se ha descrito la capacidad del patógeno de producir enfermedad en plantas de melón y sandía en cultivos sin suelo, así como de reducir la producción en cultivos sin suelo de tomate (Gómez, 2004).

La diseminación del patógeno se produce por el agua de riego mediante las zoosporas producidas en los esporangios. La supervivencia en los momentos en que no hay cultivo, se atribuye a la permanencia en forma de esporas sexuales (oosporas) en los restos de cosecha (Gómez, 1994). El tubo germinal de las esporas o el micelio saprofito de *Pythium* entra en contacto con las semillas (o los tejidos de las plántulas) de las plantas hospedantes, debido a que los exudados de esas plantas les sirve al hongo como nutrientes y estimulantes quimiotrópicos para sus zoosporas y micelio, los cuales crecen o se mueven

en dirección a las plantas. El hongo penetra directamente en las semillas a través de sus cubiertas hinchadas y humedecidas, o bien a través de hendiduras, o incluso puede penetrar al embrión o los tejidos de las plántulas emergentes mediante presión mecánica y degradación enzimática (Messiaen, 1995).

#### **3.3.4. *Phytophthora parasitica* (Pp)**

La denominación de este patógeno ha sido objeto de controversia durante muchos años. Así, el nombre *P. parasitica* fue propuesto por Tucker (1931) para todos los aislados de *Phytophthora* que se caracterizan por el tipo de crecimiento en medio de cultivo, la papila de los esporocitos, la abundancia de clamidosporas en medio de cultivo, la posición anfigena del anteridio y la capacidad de crecer a 35°C en medio de cultivo. Actualmente, se ha adoptado el nombre de *P. nicotianae* de acuerdo a las indicaciones del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN) (Bruna y Tobar, 2004).

*P. nicotianae* (*P. parasitica*) es el agente causal responsable de numerosas enfermedades en muchos y diversos cultivos incluyendo hortalizas y especies ornamentales. También es igualmente diversa la sintomatología a la que da lugar su ataque, pues puede producir podredumbre radicales y del cuello en las plantas, podredumbres marrones en frutos, gomosis en los tallos y distintas enfermedades en hojas, flores y frutos, (Messiaen, 1995).

La presencia de este patógeno en las zonas de cultivo de tomate tipo cereza de la costa de Granada y del interior de Granada y Almería tiene actualmente una gran relevancia tanto agronómica como social, ya que puede llegar a ser un factor limitante para la creciente expansión del cultivo en las zonas fundamentalmente del interior. Blancard (1990) describe como, en el cultivo de tomate, el desarrollo de la enfermedad se ve favorecido por situaciones que dan lugar a estrés en el sistema radicular, como riegos excesivos o bajas temperaturas del suelo o sustrato, especialmente durante las primeras semanas tras el transplante.



### **3.3.5. *Botrytis cinerea* (Bc)**

*Botrytinia fuckeliana* se caracteriza por la producción de esclerocios poco diferenciados en forma de corteza de pan y provistos de apotecios muy extraños. Es conocida sobre todo por su forma conídica *Botrytis cinerea*, la cual tiene el aspecto de un enmohecimiento gris y produce un número de esporas muy considerable (Messiaen, 1995).

*B. cinerea* es un parásito débil, no especializado. Las más diversas plantas pueden ser atacadas por *B. cinerea*: hojas y vainas de leguminosas, tal y frutos de cucurbitáceas y solanáceas, lechugas, fresas, etc. (Messiaen, 1995).

La penetración en hojas, tallos o frutos tiene lugar a través de una herida, grieta de crecimiento o de una base nutritiva constituida por una flor marchita, una hoja senescente o acumulación de polen. Los ataques son temibles en condiciones húmedas y a temperaturas comprendidas entre los 15 y 20 °C sobre plantas etioladas por condiciones de insuficiente luminosidad, (Messiaen, 1995)

Como métodos de lucha más oportunos contra este patógeno han de reconsiderarse los fenómenos de antagonismo (Messiaen, 1995).

### **3.3.6. *Verticillium dahliae* (Vd)**

*Verticillium dahliae* es el agente causal de la enfermedad conocida como Verticilosis, la cual produce marchiteces que afectan a una amplia gama de plantas en diversas zonas del mundo (Diáñez, 2005).

Los microesclerocios de *V. dahliae*, están adaptados a soportar condiciones ambientales adversas. Gracias a ellos, el hongo persiste en el suelo durante años, incluso en ausencia de plantas susceptibles o en condiciones de no cultivo. La elevada gama de plantas huéspedes de *V. dahliae*, entre las que figuran malas hierbas de hoja ancha, le permite aumentar su población en el suelo con facilidad. Esto es particularmente importante en los campos próximos al olivar con cultivos susceptibles, como algodón, cártamo, girasol, remolacha y diversas hortalizas (berenjena, patata, pimiento y tomate). Las plantas infestadas de estas especies aportan inóculo al suelo en forma de

microesclerocios, una vez que los restos de cosecha son descompuestos por la actividad microbiana (Diáñez, 2005).

La variabilidad patogénica de las poblaciones de *V. dahliae* es amplia (Blanco *et al*, 1994). *V. dahliae* ataca a más de 200 especies de plantas, la mayoría de ellas son hortalizas, como es el caso del tomate, berenjena, pimiento, melón y sandía; flores como el crisantemo, aster, rosales y dalia; árboles frutales, como el albaricoque y cerezo; otras especies como las fresas, frambuesas, algodón, patata, alfalfa, cacahuetes, menta, olivos, arces y olmos (Diáñez, 2005).

El modo de desarrollo de los síntomas depende principalmente de la especie de huésped. Los ataques iniciales de *V. dahliae* en campo son, en general, atenuados, las plantas enfermas están dispersas o en grupos, aunque raras veces en rodales. Los síntomas de huéspedes herbáceos, incluyen una pérdida de turgencia que se observa como una flaccidez diurna seguida por una marchitez transitoria o permanente; la marchitez se desarrolla en general de forma acrópeta y se acompaña por clorosis marginal o intervenal. En el caso de infecciones graves, es frecuente la desecación de hojas seguida de defoliación prematura. Las plantas enfermas pueden llegar a enanizarse y desarrollar un cambio de coloración en los haces vasculares (amarillo, naranja o pardo claro en las cucurbitáceas, pardo a pardo oscuro en las solanáceas, malváceas y otros huéspedes, y en general verde oscuro en *Acer* spp.) fácil de detectar. La infección grave lleva a la muerte prematura de las plantas. Los frutales de hueso infectados por *V. dahliae* muestran marchitez de ramas individuales, amarillez, necrosis de las hojas y defoliación ocasional; ocasionando en muchos casos la muerte total de la planta. El pardeamiento vascular es muy oscuro. En las ramas enfermas de los olivos, los primeros síntomas que aparecen son en las hojas, perdiendo éstas su brillo plateado volviéndose gris opacas, luego pardo pálido, y por último, adquieren un color castaño. La velocidad de expresión de los síntomas en las plantas leñosas es muy variable, desde una progresión lenta a un colapso súbito; los árboles parcialmente infectados, tienen tendencia a recuperarse formando un nuevo crecimiento no infectado, si no tiene lugar la reinfección de las raíces durante la siguiente estación vegetativa (Diáñez, 2005).

### **3.3.7. *Didymella bryoniae* (Db)**

*Didymella bryoniae* es causante del chancro gomoso de las cucurbitáceas. Afecta a la hojas, tallos y frutos de numerosas cucurbitáceas, como pepino, sandía, melón, etc.

Las hojas son penetradas directamente a través de la cutícula o a través de los espacios intercelulares alrededor de la base de los tricomas. Los tallos son penetrados a través de las heridas o por la extensión de las lesiones foliares. Los síntomas provocados son la aparición de manchas circulares en las hojas, de color marrón a pardo oscuro, frecuentemente primero en los márgenes pero expandiéndose rápidamente por toda la hoja. En los cotiledones y tallos de las plantas jóvenes aparecen manchas circulares, de color negro a marrón. En el tejido cortical del tallo se desarrollan chancros, y corrientemente se produce un exudado gomoso, de color pardo, en la superficie. En los chancros pueden aparecer pequeños cuerpos fructíferos negros. En los frutos infectados se desarrollan pequeñas manchas acuosas que posteriormente exudan material gomoso (Maroto *et al.* 2002).

# **Material y métodos**

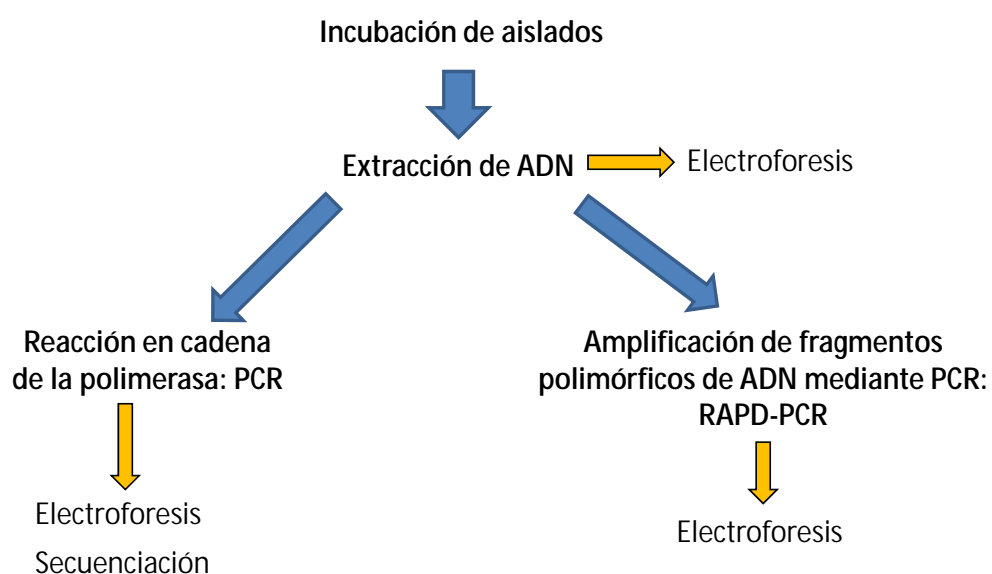
## 4.1. INTRODUCCIÓN

Tras el estudio realizado por Santos *et al.* (2009) de suelos supresivos a la Fusariosis vascular se pudieron aislar una serie de microorganismos con una alta capacidad de antagonismo *in vitro* frente a algunos de los patógenos, tanto edáficos como aéreos, más importantes de la agricultura intensiva. Se seleccionaron 4 aislados de *Paecilomyces* sp. (P1, P2, P3 y P4) y 2 aislados de *Trichoderma* sp. (T1 y T2) por sus buenas aptitudes para el control de enfermedades hortícolas, mostrando éstos últimos, además, capacidad promotora del crecimiento vegetal.

Se procede, por lo tanto, a la identificación a nivel de especie de dichos aislados, así como al conocimiento de la variabilidad genética existente entre ellos mediante análisis moleculares, además de evaluar la capacidad antagonista de los metabolitos producidos por éstos, tanto volátiles como no volátiles, frente a los ocho fitopatógenos citados anteriormente en el apartado 3.3.

## 4.2. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS CON ALTA CAPACIDAD ANTAGONISTA *IN VITRO* DE PATÓGENOS MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES

El diagrama experimental planteado para este ensayo es el expuesto a continuación:



**Figura nº 5.** Pasos seguidos en el ensayo sobre identificación y caracterización de los aislados.

Para la realización de este ensayo se debe primeramente incubar los microorganismos con capacidad antagonista para, más tarde, proceder a la extracción de ADN. Este ADN se utilizará, por un lado, para amplificarlo mediante PCR utilizando un par de cebadores específicos y conocer así la secuencia comprendida entre ambos con el fin de compararlo con una base de datos e identificarlo. Por otra, para amplificarlo mediante RAPD-PCR y el uso de cuatro cebadores inespecíficos y así estudiar la variabilidad genética existente (Figura nº 5).

#### **4.2.1. Incubación de aislados**

Cada uno de los aislados seleccionados se incuban en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Cuando el crecimiento del micelio ocupa la mitad del diámetro de la placa, se procede a un repique de cada uno de los aislados, escogiendo para su multiplicación una punta de hifa situada en la periferia del crecimiento micelial, con el fin de conseguir un cultivo procedente de una sola conidia para cada antagonista. De esta manera se consigue que la variabilidad genética de cada muestra sea mínima.

A continuación, los aislados se inoculan en medio líquido malta-dextrosa utilizando tubos Falcon<sup>®</sup> y se incuban en agitación a 120 rpm durante 24 horas.

Posteriormente se recogen muestras de micelio de cada antagonista y se depositan en tubos Eppendorf<sup>®</sup> debidamente rotulados para su posterior identificación.

#### **4.2.2. Extracción de ADN**

La extracción de ADN se lleva a cabo utilizando una modificación del kit comercial Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit, de la marca Promega<sup>®</sup>, pues se ha tenido que adaptar el protocolo original a las características de los hongos utilizados.

Las muestras se centrifugan durante 2 minutos a 12000 rpm para concentrar el material celular y se elimina el máximo líquido posible con la ayuda de una micropipeta.

El procedimiento empleado es el expuesto a continuación:

1. Congelar las muestras en nitrógeno líquido y machacar con bastones.
2. Aplicar 600  $\mu$ L de Nuclei Lysis Solution y agitar moderadamente en vortex.
3. Baño a 65 °C durante 30 min.
4. Añadir 4  $\mu$ L ARNasa, 6  $\mu$ L Proteinasa K y 6  $\mu$ L  $\beta$ -Mercaptoetanol. Agitar en vortex.
5. Baño a 37 °C durante 15 min.
6. Mantener a temperatura ambiente (RT) durante 5 min.
7. Añadir 200  $\mu$ L de Protein Precipitation Solution y agitar en vortex.
8. Centrifugar a máximas revoluciones durante 3 min. Se formará un pellet.
9. Llevar sobrenadante a un vial limpio que contiene 600  $\mu$ L de Isopropanol a RT.
10. Mezclar por inversión.
11. Centrifugar a máximas revoluciones durante 1 min.
12. Eliminar sobrenadante.
13. Añadir 600  $\mu$ L de Etanol al 70 % a RT e invertir el vial varias veces.
14. Centrifugar a máximas revoluciones durante 1 min.
15. Eliminar el sobrenadante (etanol) (Abajo puede verse un pellet)
16. Invertir los viales sobre un papel absorbente durante 15 min.
17. Añadir 100  $\mu$ L de DNA Rehydration Solution.
18. Mantener en el baño a 65 °C durante 1 hora, invirtiendo los tubos periódicamente.
19. Mantener a RT o 4 °C durante toda la noche.
20. Conservar a 2 – 8 °C.

#### **4.2.2.1. Electroforesis del ADN**

Tras la extracción de ADN se procede a la electroforesis en gel de agarosa, tinción con bromuro de etidio y visualización con captador de geles para confirmar la correcta extracción de ADN.

Se sigue el método descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Para ello, en un vaso de precipitado se preparan 100 mL de una disolución al 2% (v/v) de TAE 1x (disolución formada por Tris, acetato y EDTA), a la cual se le añaden 0'80 g de agarosa. Seguidamente

se calienta en el microondas hasta que se disuelve la agarosa y se vierte en el molde correspondiente, se colocan los peines para hacer los pocillos en los cuales se depositarán las muestras y se deja enfriar para que solidifique. Una vez endurecido el gel, se coloca en la cubeta de electroforesis y se cubre con una solución de TAE 1x.

En cada pocillo del gel de agarosa se cargan 8  $\mu\text{L}$  de una mezcla formada por 5  $\mu\text{L}$  de ADN y 3  $\mu\text{L}$  de tampón de carga (Loading Buffer DNA). Cada cuatro pocillos se carga un quinto con 4  $\mu\text{L}$  de marcador (DNA Ladder) de 100 pb. Éste deja un rastro en el gel cada 100 pares de bases, gracias al cual se puede determinar de forma precisa el tamaño de las bandas de amplificación.

La electroforesis se realiza mediante la aplicación de una corriente eléctrica. El ADN es una molécula con carga negativa, por lo que si una muestra de ADN se deposita en un medio poroso, en este caso gel de agarosa, y se le aplica un campo eléctrico, se producirá el desplazamiento de los distintos fragmentos de ADN, desplazándose en mayor o menor medida en función de su tamaño o longitud. Por ello, la cubeta de electroforesis se conectó a una fuente de alimentación 90-100 V durante 15-20 minutos.

Terminada la electroforesis, el gel se sumerge en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 g/L. El gel de agarosa debe permanecer sumergido en la disolución durante 20 minutos. El bromuro de etidio es un compuesto que se intercala en la doble hélice de ADN y produce una luz anaranjada cuando es iluminado con luz ultravioleta. El captador de geles utilizado fue un Biosens SC750 (Biojim Trading Co; Ltd.) con transiluminador de luz ultravioleta de 312 nm de longitud de onda incorporada, el cual dispone de una cámara fotográfica digital monocromática de 752 x 582 ppp. El software utilizado para visualizar y guardar las imágenes fue BioSenc Gel Imagin System<sup>®</sup>.

#### **4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR**

El protocolo que se ha seguido para la realización de la PCR es el siguiente:

1. Se procede a sacar los ingredientes del frigorífico (ADN, cebadores ITS1 e ITS4, dNTPs,  $\text{Mg}^{+2}$ , tampón). La Taq polimerasa se saca del frigorífico



segundos antes de introducirla en los tubos de PCR, ya que a partir de cierta temperatura crítica esta enzima actúa de forma espontánea.

- La gradilla para tubos de PCR de 0,25 mL se coloca sobre una base de hielo picado. Tras su etiquetado se añade a cada uno de ellos 8  $\mu\text{L}$  de ADN, 33,25  $\mu\text{L}$  de agua miliQ, 5  $\mu\text{L}$  de tampón, 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{Mg}^{+2}$ , 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 0,25  $\mu\text{L}$  de cebador ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) y otros 0,25  $\mu\text{L}$  de ITS4. (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Cuadro n° 1).

AÑADIR A CADA TUBO DE PCR (0,25 mL)
8 $\mu\text{L}$ ADN
33,25 $\mu\text{L}$ agua miliQ
5 $\mu\text{L}$ de tampón
2 $\mu\text{L}$ de $\text{Mg}^{+2}$
1 $\mu\text{L}$ de dNTPs
0,25 $\mu\text{L}$ de cebador ITS1
0,25 $\mu\text{L}$ de cebador ITS4

**Cuadro n° 1.** Reactivos y cantidades necesarias para la reacción de PCR.

- Una vez introducidas todas las cantidades del apartado anterior se procede a introducir por último 4  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa.
- Todos los tubos de PCR se pasan al termociclador modelo Biocycler TC-S, el cual se configura bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 min, para terminar con una extensión final de 10 min a 72  $^{\circ}\text{C}$ .
- Transcurrido este tiempo se obtienen los productos de la PCR final.

#### **4.2.3.1. Electroforesis de los productos de la PCR**

Los productos obtenidos de la amplificación se someten a electroforesis para confirmar la correcta realización de la PCR. El procedimiento llevado a cabo es idéntico al explicado en el apartado 4.2.2.1.

#### **4.2.3.2. Secuenciación de las bandas amplificadas**

Los productos de la PCR se envían al servicio de ácidos nucleicos de la Universidad de Almería para la secuenciación de las bandas obtenidas. Las muestras se han secuenciado bidireccionalmente en un secuenciador ABI 3700 (Applied Biosystems®) de Macrogen Inc. (Corea), en los servicios técnicos de la Universidad de Almería.

#### **4.2.4. Amplificación de fragmentos polimórficos de ADN mediante PCR: Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR)**

Esta técnica ha sido utilizada para conocer la variabilidad genética existente entre los diferentes aislados, pudiendo así diferenciar entre cepas.

El proceso llevado a cabo es el mismo que el explicado anteriormente en el apartado 4.2.3. La única diferencia estriba en el uso de los cebadores (AGG)<sub>5</sub>, (CAG)<sub>5</sub>, (GACA)<sub>4</sub> y (GACAC)<sub>3</sub> en lugar de los ITS1 e ITS4 utilizados para la identificación específica. Estos cebadores derivan de los siguientes microsatélites o secuencias repetitivas conocidas: AGGAGGAGGAGGAGG, CAGCAGCAGCAGCAG, GACACGACACGACAC y GACAGACAGACAGACA.

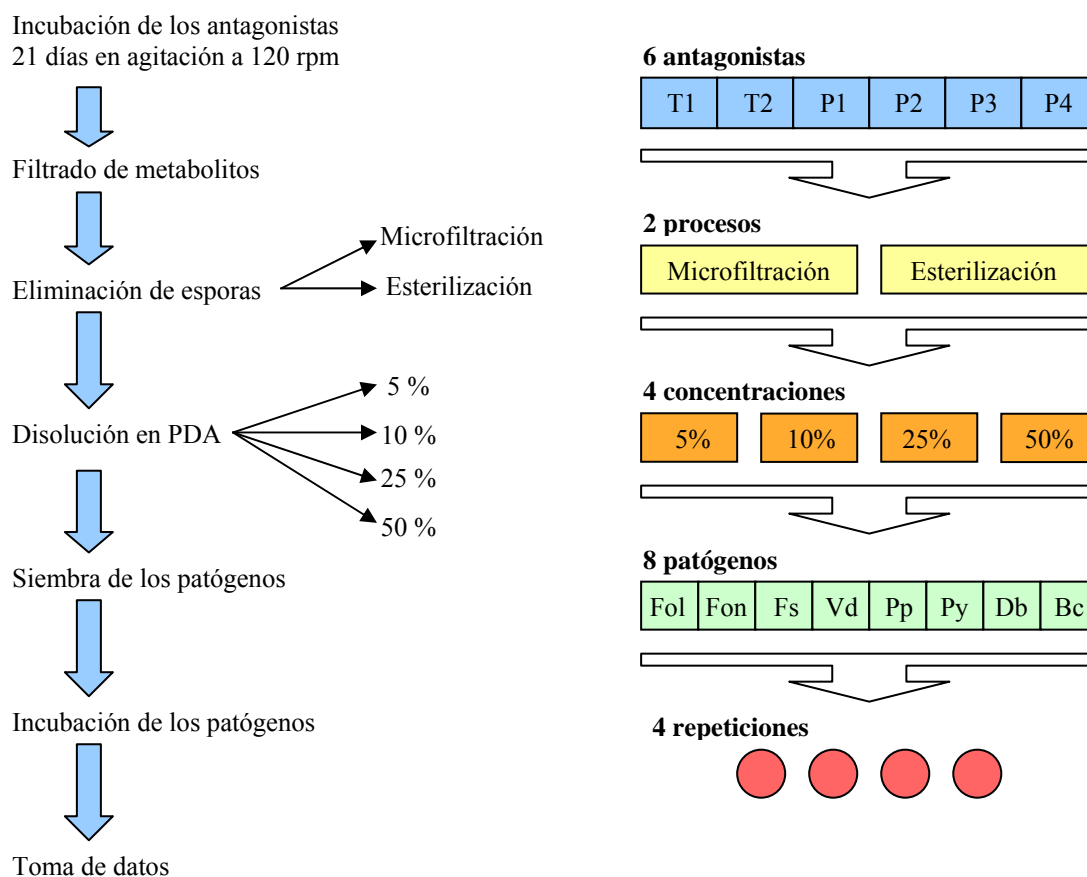
#### **4.2.4.1. Electroforesis de los productos de la RAPD-PCR**

La electroforesis, posterior tinción y visualización mediante captador de geles permite observar las diferencias entre las regiones amplificadas de cada aislado, obteniendo un patrón de bandas característico para cada uno de ellos.

### 4.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS METABOLITOS NO VOLÁTILES PRODUCIDOS POR DIFERENTES HONGOS ANTAGONISTAS PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO MICELIAL *IN VITRO* DE CIERTOS PATÓGENOS

En este ensayo se evalúa el efecto antagonista que provocan los metabolitos exudados por los aislados frente a los fitopatógenos descritos anteriormente en el apartado 3.3. Para ello, los microorganismos antagonistas se cultivan en medio líquido, el cual posteriormente es filtrado y sometido a 2 procesos de eliminación de esporas de forma paralela (microfiltración ó esterilización). Con estos extractos se elaboran los diversos medios de cultivo PDA sobre los cuales crecerán los microorganismos fitopatógenos, utilizando 4 concentraciones distintas de éste (5%, 10%, 25% y 50%).

El diseño experimental seguido es el expuesto a continuación (Figura nº 6):



**Figura nº 6.** Pasos seguidos en el ensayo sobre el efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados.

### 4.3.1. Incubación de antagonistas

Los aislados seleccionados se inoculan cada uno en un frasco de 1L con medio de cultivo líquido PD (patata-dextrosa) en agitación a 120 rpm durante 21 días.

Tras la incubación, el medio de cultivo líquido resultante del crecimiento de los antagonistas se filtra y conserva para su posterior utilización en la preparación del PDA.

### 4.3.2. Preparación del medio de cultivo

Se prepararon 49 botes de 0,5 L, rotulados adecuadamente, cada uno conteniendo: 10 g de agar, 5 g de glucosa y caldo correspondiente a 100 g de patata.

En nuestro diseño experimental se han utilizado cuatro concentraciones distintas de extracto para evaluar la capacidad antagonista de los microorganismos estudiados. Por ello, los botes se distribuyen en 4 lotes, además del testigo, y se enrasan con las cantidades descritas a continuación (Cuadro nº 2):

	Concentración	Extracto (mL)	PDA (mL)
<b>Lote a</b>	5%	25	475
<b>Lote b</b>	10%	50	450
<b>Lote c</b>	25%	125	375
<b>Lote d</b>	50%	250	250
<b>Testigo</b>	0%	0	500

**Cuadro nº 2.** Cálculo de cantidades de extracto y PDA.

### **4.3.3. Procesado y adición de extractos**

La esterilización puede provocar la desnaturalización de ciertas enzimas o la alteración de determinadas sustancias con efecto antagonista debido a las altas temperaturas alcanzadas en el autoclave, por lo que la capacidad antagonista de los extractos puede verse mermada. Esto no ocurre mediante microfiltración, ya que en este caso tanto las esporas de los antagonistas como los microorganismos contaminantes quedan retenidas en una membrana.

Por ello, se preparan dos tipos de medio de cultivo de cada antagonista, uno microfiltrado y otro esterilizado, ambos libres de esporas y otros contaminantes externos.

Los extractos procedentes del crecimiento micelial en agitación se someten a dos procesos de forma paralela. Para los tratamientos a base de extractos esterilizados, éstos se añaden a los botes correspondientes y posteriormente se procede a la esterilización del medio de cultivo ya preparado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. En cambio, los botes con el PDA sobre el cual se añadirán los extractos microfiltrados se introducen previamente en el autoclave. Posteriormente se añaden los extractos, agregándolos a los botes con la ayuda de un filtro de jeringa de 0,2 µm de diámetro, quedando los contaminantes retenidos en éste. Seguidamente se plaquean los diversos medios de cultivo en las placas ya rotuladas.

### **4.3.4. Inoculación de patógenos**

Como fuentes de inóculo se utilizan placas previamente incubadas con los distintos fitopatógenos, colocando un trozo de 5 mm de diámetro de medio agarizado con el microorganismo a evaluar, con la ayuda de un sacabocados estandarizado, en el centro de cada una de las placas correspondientes.

Los testigos están formados por el patógeno inoculado sobre medio de cultivo PDA sin extracto añadido.

El ensayo se incuba en laboratorio a temperatura ambiente. Se toman medidas de crecimiento cada uno o dos días, en base a la velocidad de crecimiento de cada patógeno.

#### 4.4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS METABOLITOS VOLÁTILES PRODUCIDOS POR DIFERENTES HONGOS ANTAGONISTAS PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO MICELIAL *IN VITRO* DE CIERTOS PATÓGENOS

El efecto de las sustancias volátiles producidas por los antagonistas se evaluará utilizando la “técnica de la placa invertida” (Dennis y Webster, 1971). Gracias a este método se puede enfrentar cada combinación patógeno-antagonista, haciendo que las posibles sustancias volátiles antagonistas entren en contacto con el fitopatógeno e impidiendo que dichos gases escapen de la zona existente entre ambas placas.

Tanto los fitopatógenos como los antagonistas se siembran en placas distintas sobre medio de cultivo PDA, enfrentando a continuación cada microorganismo antagonista con su respectivo fitopatógeno, haciendo 3 repeticiones de cada combinación (Figura n° 7).

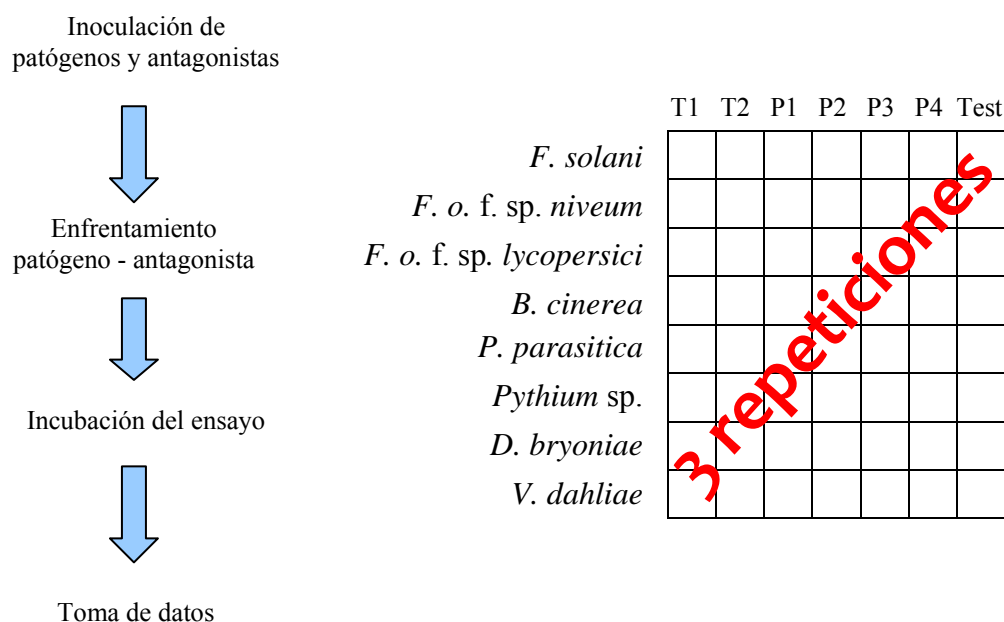


Figura n° 7. Planteamiento experimental del ensayo sobre metabolitos volátiles.

#### 4.4.1. Inoculación de patógenos y antagonistas

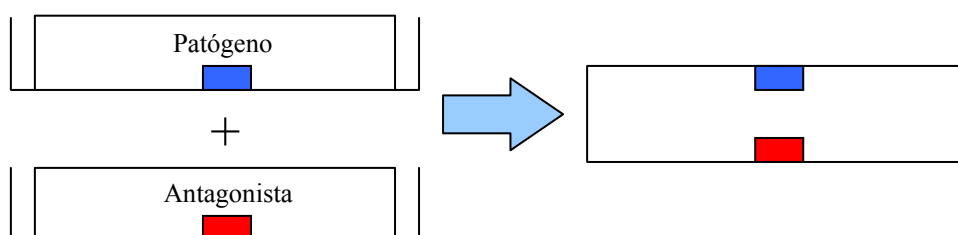
Patógenos y antagonistas se siembran sobre medio de cultivo PDA (patata-dextrosa-agar) en placas de Petri separadas.

Debido a la excesiva esporulación observada en todos los aislados del género *Paecilomyces*, se decide inocular los aislados de este género de forma distinta:

- Los aislados del género *Trichoderma* (T1 y T2) y todos los fitopatógenos se inoculan situando un trozo de agar de 5 mm de diámetro que contiene al hongo en cuestión, obtenido mediante un sacabocados estandarizado, en el centro de la placa de Petri.
- Los aislados del género *Paecilomyces* (P1, P2, P3 y P4) se inoculan mediante raspado de las esporas y extensión homogénea sobre PDA con asa de siembra esterilizada. Posteriormente se seleccionan unas conidias individuales que se siembran en cada una de las repeticiones, ya que este hongo dispersaba mucho las esporas al disponer trozos de agar con inóculo sobre el medio de cultivo.

#### 4.4.2. Enfrentamiento patógeno-antagonista

Las placas sembradas con los patógenos se colocan invertidas sobre las placas que contienen los antagonistas, quedando el antagonista siempre en la cara inferior (Figura nº 8). También se preparan “placas invertidas” sin antagonista que sirven de testigo control. Se realizan 3 repeticiones de cada tratamiento. Las placas se sellan con celo y plástico film para impedir la contaminación y/o salida de gases. El ensayo se incuba en laboratorio a temperatura ambiente. Se toman medidas de crecimiento cada uno o dos días, en base a la velocidad de crecimiento de cada fitopatógeno.



**Figura nº 8.** Colocación de las placas para la evaluación de los metabolitos volátiles.

## **4.5. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS**

Las recetas que se presentan a continuación están calculadas para la preparación de 1L de medio de cultivo.

### **4.5.1. Medio de cultivo PDA (patata-dextrosa-agar)**

Se pelan y pesan 200 g de patatas. Se cortan en pequeños trozos y se ponen en un vaso de precipitado. El vaso se enrasa con agua destilada hasta 500 mL. Se pone a cocer en el microondas durante 15 minutos. Una vez cocido se filtra con una muselina en una probeta de 1 L y se añaden 20 g de dextrosa (glucosa) y 17 g de agar. Se enrasa con agua destilada hasta 1 L y se pasa a un bote de vidrio de esterilización. Se introduce en el autoclave durante 30 minutos a una temperatura de 121° C.

### **4.5.2. Medio de cultivo PD (patata-dextrosa)**

Se prepara igual que en el caso anterior pero no se añade agar a la mezcla, quedando el medio de cultivo en estado líquido.

### **4.5.3. Medio de cultivo AM (agar-malta)**

Se prepara 1 L de agua al que se le añade 10 g de malta y 20 g de agar, introduciéndose posteriormente en el autoclave a 121 °C durante 30 minutos para su esterilización.



# Resultados

---

## 5.1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS

### 5.1.1. Estudio de identificación específica

Una vez purificadas las muestras de ADN, éstas se envían al Servicio de Análisis de Ácidos Nucleicos de la Universidad de Almería, donde se realiza la secuenciación de los fragmentos de ADN. Tras recibir los resultados se procede a la corrección de las secuencias, mediante el programa informático ChromasPro 2.33, para más tarde introducirlas en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e identificar cada uno de los aislados.

#### 5.1.1.1. Secuencias de los aislados del género *Trichoderma*

##### 5.1.1.1.1. Secuenciación del fragmento correspondiente a T1-ITS4

El alineamiento de la secuencia perteneciente al aislado T1 en la base de datos del NCBI muestra una alta homología con *T. saturnisporum* (99%), con un número de abcesión AF359403. (Imagen nº 1 y 2).

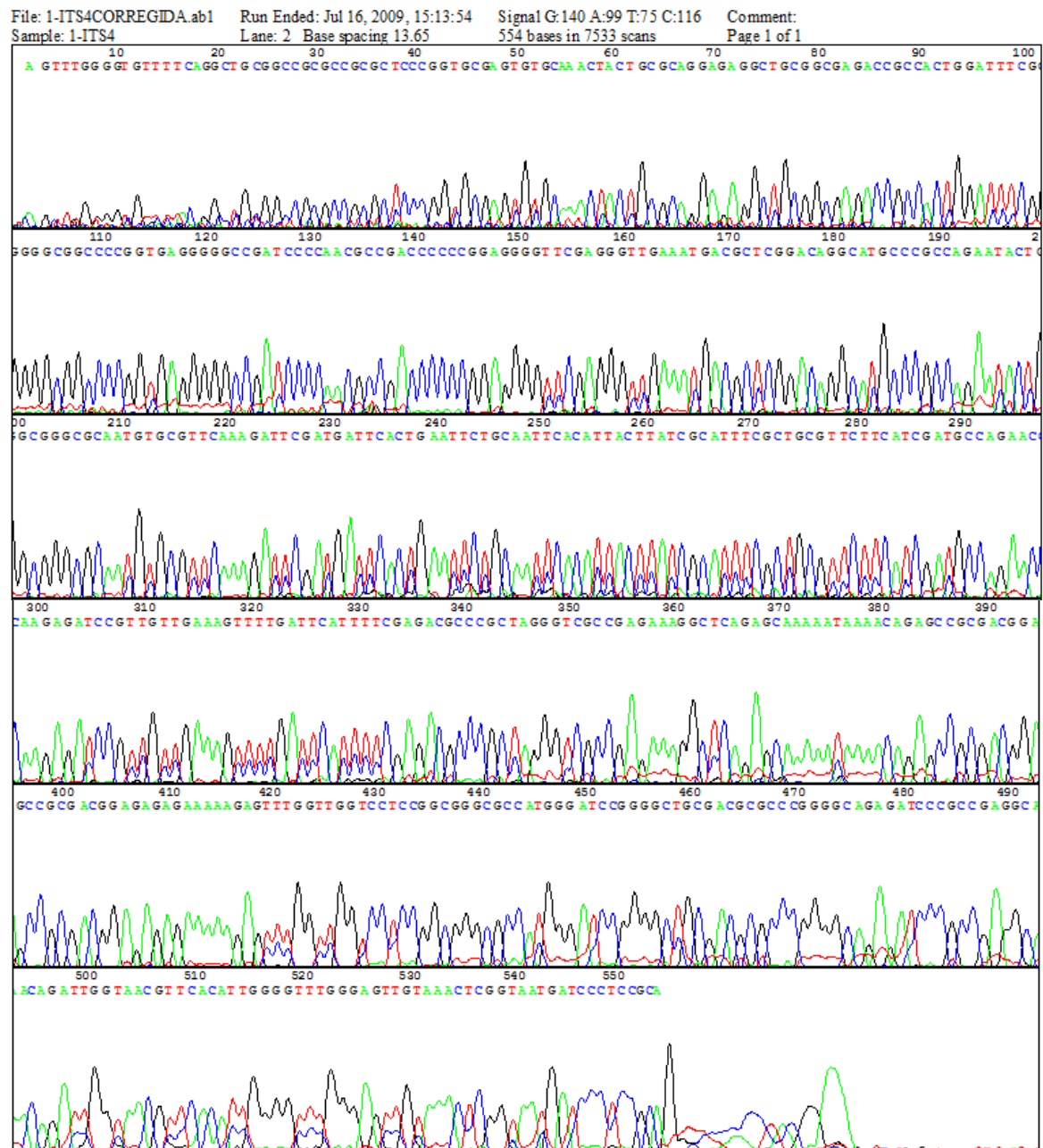


Imagen n° 1. Secuenciación del fragmento ITS4 correspondiente al aislado T1.

Query ID |d|16143 Database Name nr  
 Description None Description Nucleotide collection (nt)  
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.2.27+ > Citation  
 Query Length 554

Other reports: > Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results]

**Graphic Summary**

**Descriptions**

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [G](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">EU280096.1</a>	Trichoderma sp. CIB T96 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inter	1005	1005	99%	0.0	99%	
<a href="#">AF359403.1</a>	Trichoderma saturnisporum strain T163 18S ribosomal RNA gene, partial s	998	998	99%	0.0	99%	
<a href="#">AJ507135.1</a>	Trichoderma sp. MA 3642 5.8S rRNA gene, ITS1 and ITS2, strain MA3642	977	977	97%	0.0	99%	
<a href="#">GU966513.1</a>	Trichoderma saturnisporum strain YQ14 18S ribosomal RNA gene, partial s	974	974	100%	0.0	98%	
<a href="#">GU176490.1</a>	Trichoderma aureoviride strain T152 18S ribosomal RNA gene, partial seq	974	974	96%	0.0	99%	
<a href="#">HQ608035.1</a>	Trichoderma konilangbra isolate CY215 18S ribosomal RNA gene, partial se	972	972	99%	0.0	98%	
<a href="#">HQ607999.1</a>	Trichoderma konilangbra isolate CY161 18S ribosomal RNA gene, partial se	972	972	99%	0.0	98%	
<a href="#">HQ630986.1</a>	Trichoderma sp. 3 TMS-2011 voucher MS3p_50-2 18S ribosomal RNA gen	972	972	99%	0.0	98%	
<a href="#">EU280102.1</a>	Trichoderma sp. DAOM 237545 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	972	972	99%	0.0	98%	
<a href="#">Z48726.1</a>	T.saturnisporum genes for 5.8S, 18S, 28S ribosomal RNA and ITS1 and IT	972	972	99%	0.0	98%	
<a href="#">X93974.1</a>	T.saturnisporum rRNA genes and ITS1 and ITS2 DNA (strain CBS 886.72)	968	968	99%	0.0	98%	
<a href="#">X93977.1</a>	T.saturnisporum rRNA genes and ITS1 and ITS2 DNA (strain ATCC 28023)	968	968	99%	0.0	98%	
<a href="#">X93973.1</a>	T.saturnisporum rRNA genes and ITS1 and ITS2 DNA (strain CBS 335.92)	968	968	99%	0.0	98%	
<a href="#">X93971.1</a>	Trichoderma pseudokoningii rRNA genes and ITS1 and ITS2 DNA, strain G.	963	963	99%	0.0	98%	
<a href="#">EF442075.1</a>	Trichoderma ghanense isolate UOKT066 small subunit ribosomal RNA gene	961	961	100%	0.0	98%	
<a href="#">DQ083012.1</a>	Trichoderma sinensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	961	961	99%	0.0	98%	

**Imagen n° 2.** Alineamiento de la secuencia ITS4 del aislado T1 en la base de datos del NCBI.

La homología que presenta la especie con *T. saturnisporum* se comprueba en la siguiente secuencia:

Trichoderma saturnisporum strain T163 18S ribosomal RNA gene,  
 partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal  
 RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence;  
 and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Length=607

Score = 998 bits (540), Expect = 0.0  
 Identities = 546/549 (99%), Gaps = 0/549 (0%)  
 Strand=Plus/Minus

```

Query 1 AGTTTGGGGTGTTTTCAGGCTGCGGCCGCGCCGCGCTCCCGGTGCAGTGTGCAAACTAC 60
      |||
Sbjct 549 AGTTTGGGGTGTTTTACGGCTGTGGCCGCGCCGCGCTCCCGGTGCAGTGTGCAAACTAC 490

Query 61 TGCGCAGGAGAGGCTGCGGCGAGACCGCCACTGGATTTCGGGGCGGCCCGGTGAGGGG 120
      |||
Sbjct 489 TGCGCAGGAGAGGCTGCGGCGAGACCGCCACTGGATTTCGGGGCGGCCCGGTGAGGGG 430

Query 121 GCCGATCCCCAACGCCGACCCCCGGAGGGTTTCAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGG 180
      |||
Sbjct 429 GCCGATCCCCAACGCCGACCCCCGGAGGGTTTCAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGG 370
  
```

```

Query 181 CATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCAGTACTGAA 240
          |||
Sbjct 369 CATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCAGTACTGAA 310

Query 241 TTCTGCAATTACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCATCATCGATGCCAGAACCAAG 300
          |||
Sbjct 309 TTCTGCAATTACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCATCATCGATGCCAGAACCAAG 250

Query 301 AGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTCGAGACGCCCGCTAGGGTCGCCGAGAAAG 360
          |||
Sbjct 249 AGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTCGAGACGCCCGCTAGGGTCGCCGAGAAAG 190

Query 361 GCTCAGAGCAAAAATAAAACAGAGCCGCGACGGAGCCGCGACGGAGAGAGAAAAAGAGTT 420
          |||
Sbjct 189 GCTCAGAGCAAAAATAAAACAGAGCCGCGACGGAGCCGCGACGGAGAGAGAAAAAGAGTT 130

Query 421 TGGTTGGTCTCCGGCGGGCGCCATGGGATCCGGGGCTGCGACGCGCCCGGGGCAGAGAT 480
          |||
Sbjct 129 TGGTTGGTCTCCGGCGGGCGCCATGGGATCCGGGGCTGCGACGCGCCCGGGGCAGAGAT 70

Query 481 CCCGCCGAGGCAACAGATTGGTAACGTTACATTGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTA 540
          |||
Sbjct 69 CCCGCCGAGGCAACAGATTGGTAACGTTACATTGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTA 10

Query 541 ATGATCCCT 549
          |||
Sbjct 9 ATGATCCCT 1

```

Gracias al árbol filogenético correspondiente se puede conocer las especies y aislados de *Trichoderma* sp. más próximas a *T. saturnisporum* con localizador (lc|16143) (Imagen n° 3).

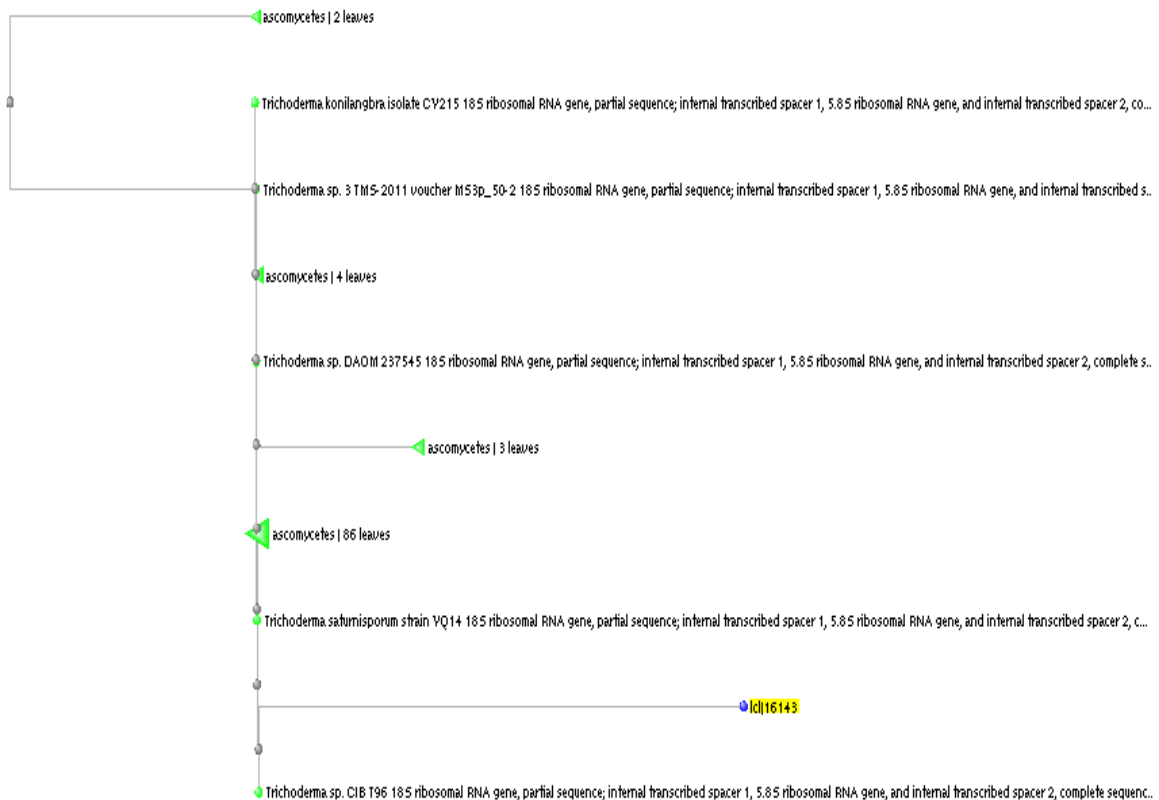


Imagen n° 3. Árbol filogenético de *T. saturnisporum* (lc|16143).

### 5.1.1.1.2. Secuenciación del fragmento correspondiente a T2-ITS1

El alineamiento de la secuencia perteneciente al aislado T2 muestra un 99% de homología entre *T. saturnisporum*, con un número de abcesión AF359403. (Imagen n° 4 y 5).

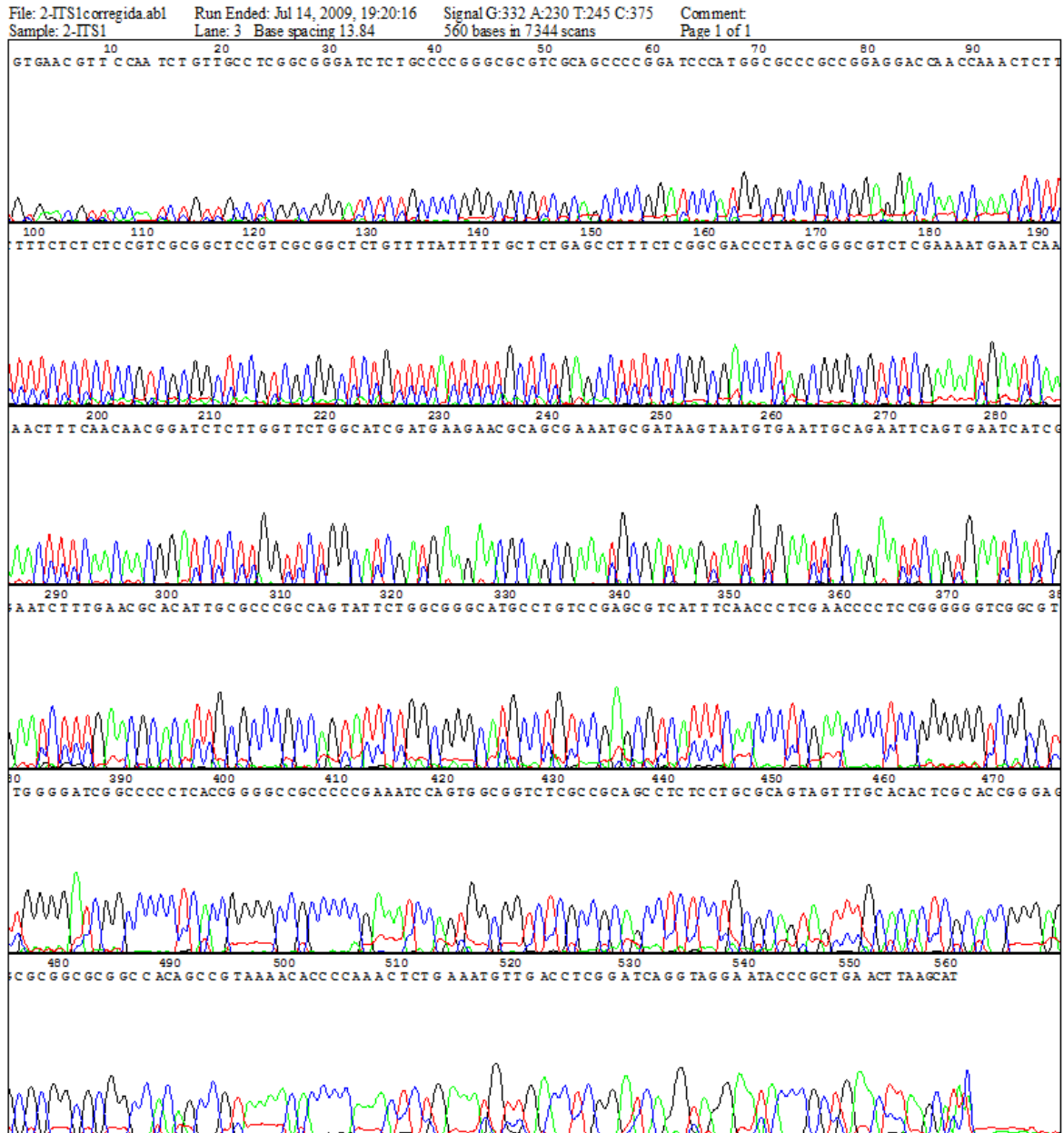


Imagen n° 4. Secuenciación del fragmento ITS1 correspondiente al aislado T2.

Query ID	Id 64675	Database Name	nr
Description	None	Description	Nucleotide collection (nt)
Molecule type	nucleic acid	Program	BLASTN 2.2.27+ <a href="#">Citation</a>
Query Length	560		

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

[Graphic Summary](#)

[Descriptions](#)

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">GU947791.1</a>	Trichoderma sp. MA 3642 strain mms1356 internal transcribed spacer 1, p	1029	1029	100%	0.0	99%	
<a href="#">EU280096.1</a>	Trichoderma sp. CIB T96 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inter	1029	1029	100%	0.0	99%	
<a href="#">AF359403.1</a>	Trichoderma saturnisporum strain T163 18S ribosomal RNA gene, partial s	1029	1029	100%	0.0	99%	
<a href="#">JQ653080.1</a>	Trichoderma sp. MA 3642 strain mms1020 internal transcribed spacer 1, p	1026	1026	100%	0.0	99%	
<a href="#">JQ653070.1</a>	Trichoderma sp. MA 3642 strain mms852 internal transcribed spacer 1, pa	1026	1026	100%	0.0	99%	
<a href="#">JQ653069.1</a>	Trichoderma sp. MA 3642 strain mms847 internal transcribed spacer 1, pa	1026	1026	100%	0.0	99%	
<a href="#">JQ653083.1</a>	Trichoderma sp. MA 3642 strain mms1397 internal transcribed spacer 1, p	1024	1024	99%	0.0	99%	
<a href="#">JQ653068.1</a>	Trichoderma sp. MA 3642 strain mms755 internal transcribed spacer 1, pa	1020	1020	99%	0.0	99%	
<a href="#">GU176490.1</a>	Trichoderma aureoviride strain T152 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	1016	1016	99%	0.0	99%	
<a href="#">GU176489.1</a>	Trichoderma longibrachiatum strain T132H 18S ribosomal RNA gene, partia	1016	1016	98%	0.0	99%	
<a href="#">JQ653090.1</a>	Trichoderma sp. MA 3642 strain mms1525 internal transcribed spacer 1, p	1013	1013	97%	0.0	100%	
<a href="#">JQ653062.1</a>	Trichoderma sp. MA 3642 strain mms591 internal transcribed spacer 1, pa	1013	1013	97%	0.0	100%	
<a href="#">HQ608035.1</a>	Trichoderma konilangbra isolate CY215 18S ribosomal RNA gene, partial se	996	996	100%	0.0	99%	
<a href="#">HQ607999.1</a>	Trichoderma konilangbra isolate CY161 18S ribosomal RNA gene, partial se	996	996	100%	0.0	99%	
<a href="#">HQ630986.1</a>	Trichoderma sp. 3 TMS-2011 voucher MS3p_50-2 18S ribosomal RNA gen	996	996	100%	0.0	99%	
<a href="#">GU966513.1</a>	Trichoderma saturnisporum strain YQ14 18S ribosomal RNA gene, partial s	996	996	100%	0.0	99%	

**Imagen n° 5.** Alineamiento de la secuencia ITS1 del aislado T2 en la base de datos del NCBI.

Podemos observar la similitud entre las secuencias del ADNr del aislado T2 y *T. saturnisporum*:

Trichoderma saturnisporum strain T163 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 25S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=607

Score = 1029 bits (557), Expect = 0.0  
Identities = 560/561 (99%), Gaps = 1/561 (0%) Strand=Plus/Plus

Query	1	GTGAACGTT-CCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCG	59
Sbjct	39	GTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCG	98
Query	60	GATCCCATGGCGCCCGCCGAGGACCAACAAACTCTTTTCTCTCTCCGTCGCGGCTCC	119
Sbjct	99	GATCCCATGGCGCCCGCCGAGGACCAACAAACTCTTTTCTCTCTCCGTCGCGGCTCC	158
Query	120	GTCGCGGCTCTGTTTTATTTTGTCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCG	179
Sbjct	159	GTCGCGGCTCTGTTTTATTTTGTCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCG	218
Query	180	AAAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAG	239
Sbjct	219	AAAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAG	278
Query	240	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA	299
Sbjct	279	CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA	338

```

Query 300 CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAA 359
          |||
Sbjct 339 CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAA 398

Query 360 CCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCCCTCACCGGGGCGCCCCCGAAATCCA 419
          |||
Sbjct 399 CCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCCCTCACCGGGGCGCCCCCGAAATCCA 458

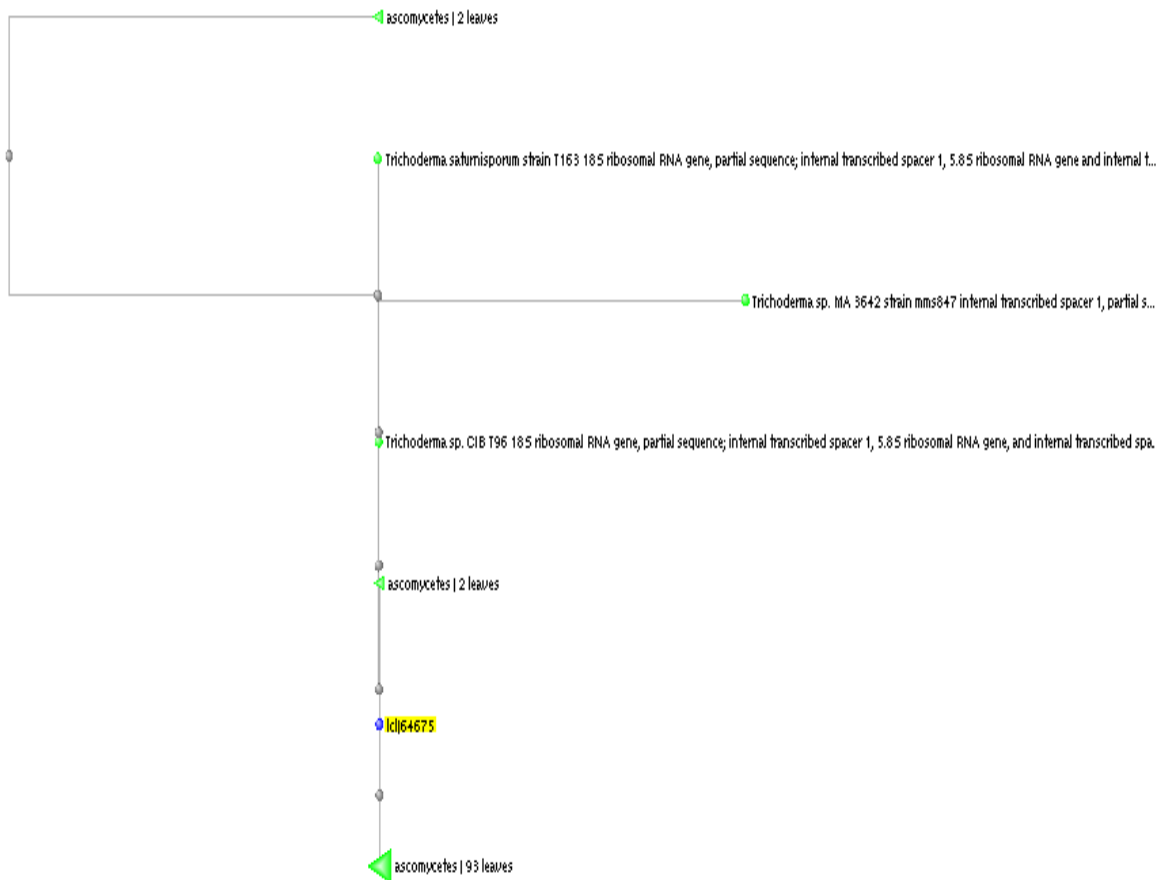
Query 420 GTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCG 479
          |||
Sbjct 459 GTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCG 518

Query 480 GCGCGGCCACAGCCGTAAAACACCCAAACTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA 539
          |||
Sbjct 519 GCGCGGCCACAGCCGTAAAACACCCAAACTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA 578

Query 540 ATACCCGCTGAACTTAAGCAT 560
          |||
Sbjct 579 ATACCCGCTGAACTTAAGCAT 599

```

Las especies de *Trichoderma* sp. más próximas a *T. saturnisporum* con localizador (lcl|64675) son las siguientes (Imagen n° 6):



**Imagen n° 6.** Árbol filogenético de *T. saturnisporum* (lcl|64675).



### 5.1.1.2. Secuencias de los aislados del género *Paecilomyces*

#### 5.1.1.2.1. Secuenciación del fragmento correspondiente a P1-ITS1

La secuencia del fragmento de ADN correspondiente al aislado P1 (Imagen n° 7) ha sido introducida en la base de datos del NCBI para ser comparada con otras secuencias ya conocidas, adjudicándosele un número de abcesión JX231004. El alineamiento de la secuencia muestra una homología del 99% entre P1 y *P. variotii* (Imagen n° 8).

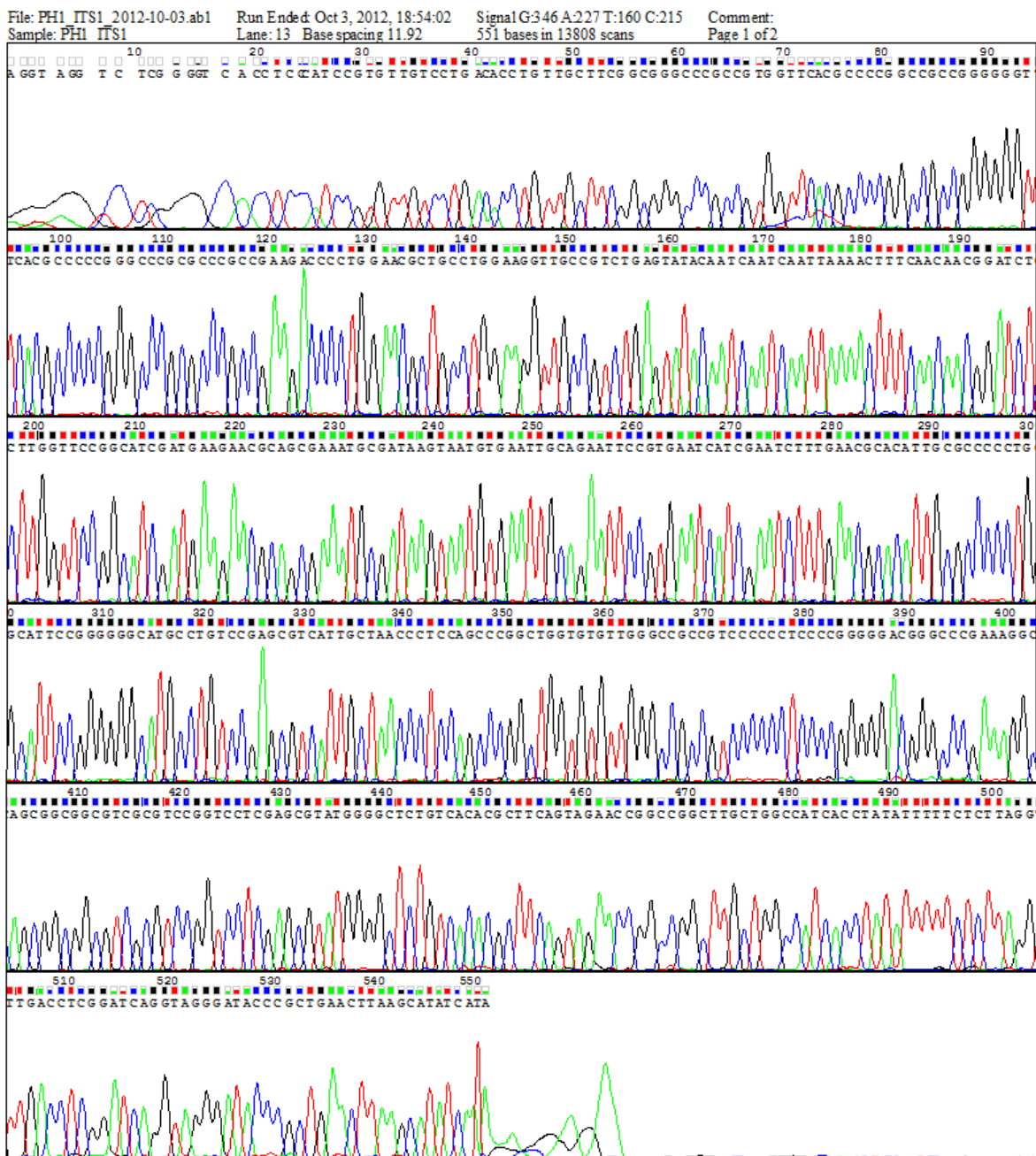


Imagen n° 7. Secuenciación del fragmento ITS1 correspondiente al aislado P1.

Query ID | Id|11865 Database Name | nr  
 Description | None Description | Nucleotide collection (nt)  
 Molecule type | nucleic acid Program | BLASTN 2.2.27+ > Citation  
 Query Length | 551

Other reports: > Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results]

**Graphic Summary**

**Descriptions** [Provide feedback on the new report](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Paecilomyces variotii strain SCSAAF0011 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	998	998	98%	0.0	99%	<a href="#">JQ647897.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Paecilomyces variotii strain LX15 18S ribosomal RNA, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	989	1302	99%	0.0	99%	<a href="#">GQ220707.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Paecilomyces variotii isolate YLJ-40 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	985	985	98%	0.0	99%	<a href="#">JX231004.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Paecilomyces variotii strain TC03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	985	985	98%	0.0	99%	<a href="#">JQ796880.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Paecilomyces sp. JH6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	985	985	98%	0.0	99%	<a href="#">GQ386857.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Paecilomyces variotii strain ATCC 10865 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	985	985	98%	0.0	99%	<a href="#">FJ345354.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Paecilomyces variotii strain HB101 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	985	985	98%	0.0	99%	<a href="#">FJ549438.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Paecilomyces variotii strain ATCC 22319 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	985	985	98%	0.0	99%	<a href="#">AY373941.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Paecilomyces variotii isolate YLJ-37 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	979	979	98%	0.0	99%	<a href="#">JX231002.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Paecilomyces variotii strain XSBN13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	979	979	98%	0.0	99%	<a href="#">GU966517.1</a>

**Imagen n° 8.** Alineamiento de la secuencia ITS1 del aislado P1 en la base de datos del NCBI.

La homología que presenta el aislado P1 con *P. variotii* se comprueba en la siguiente secuencia:

Paecilomyces variotii isolate YLJ-40 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence  
 Sequence ID: gb|JX231004.1|Length: 627Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
985 bits(533)	0.0	540/543(99%)	2/543(0%)	Plus/Plus	
Query	9	CTCGGGG-TC-ACCTCCCATCCGTGTTGTCTGCACACCTGTTGCTTcggcgggcccgccg			66
Sbjct	71	CTCGGGGCCCAACCTCCCATCCGTGTTGTCTGCACACCTGTTGCTTcggcgggcccgccg			130
Query	67	tggttcacgccccggccgccccggggggttcacgccccgggcccgcgcccgcgAAGACCC			126
Sbjct	131	TGGTTCACGCCCCGGCCGCCGGGGGTTTCACGCCCCGGGCCCGCCGCCGAAGACCC			190
Query	127	CTGGAACGCTGCCTGGAAGGTTGCCGTCTGAGTATAACAATCAATCAATTTAAACTTTCAA			186
Sbjct	191	CTGGAACGCTGCCTGGAAGGTTGCCGTCTGAGTATAACAATCAATCAATTTAAACTTTCAA			250

---

```

Query 187 CAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG 246
          |||
Sbjct 251 CAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG 310

Query 247 AATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCC 306
          |||
Sbjct 311 AATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCC 370

Query 307 GGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTAACCCCTCCAGCCCGGCTGGTGTGTTGGGCC 366
          |||
Sbjct 371 GGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTAACCCCTCCAGCCCGGCTGGTGTGTTGGGCC 430

Query 367 GCCGTCCCCCTCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGCGGCGTCGCGTCCGGTCCT 426
          |||
Sbjct 431 GCCGTCCCCCTCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGCGGCGTCGCGTCCGGTCCT 490

Query 427 CGAGCGTATGGGGCTCTGTCACACGCTTCAGTAGAACCGCCGGCTTGCTGGCCATCACC 486
          |||
Sbjct 491 CGAGCGTATGGGGCTCTGTCACACGCTTCAGTAGAACCGCCGGCTTGCTGGCCATCACC 550

Query 487 TATATTTTCTCTTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA 546
          |||
Sbjct 551 TATATTTTCTCTTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA 610

Query 547 TCA 549
          |||
Sbjct 611 TCA 613

```

En el árbol filogenético se puede observar las especies de *Paecilomyces* sp. que se encuentran más próximas a *P. variotii* con localizador (lcl|11865) (Imagen nº 9).

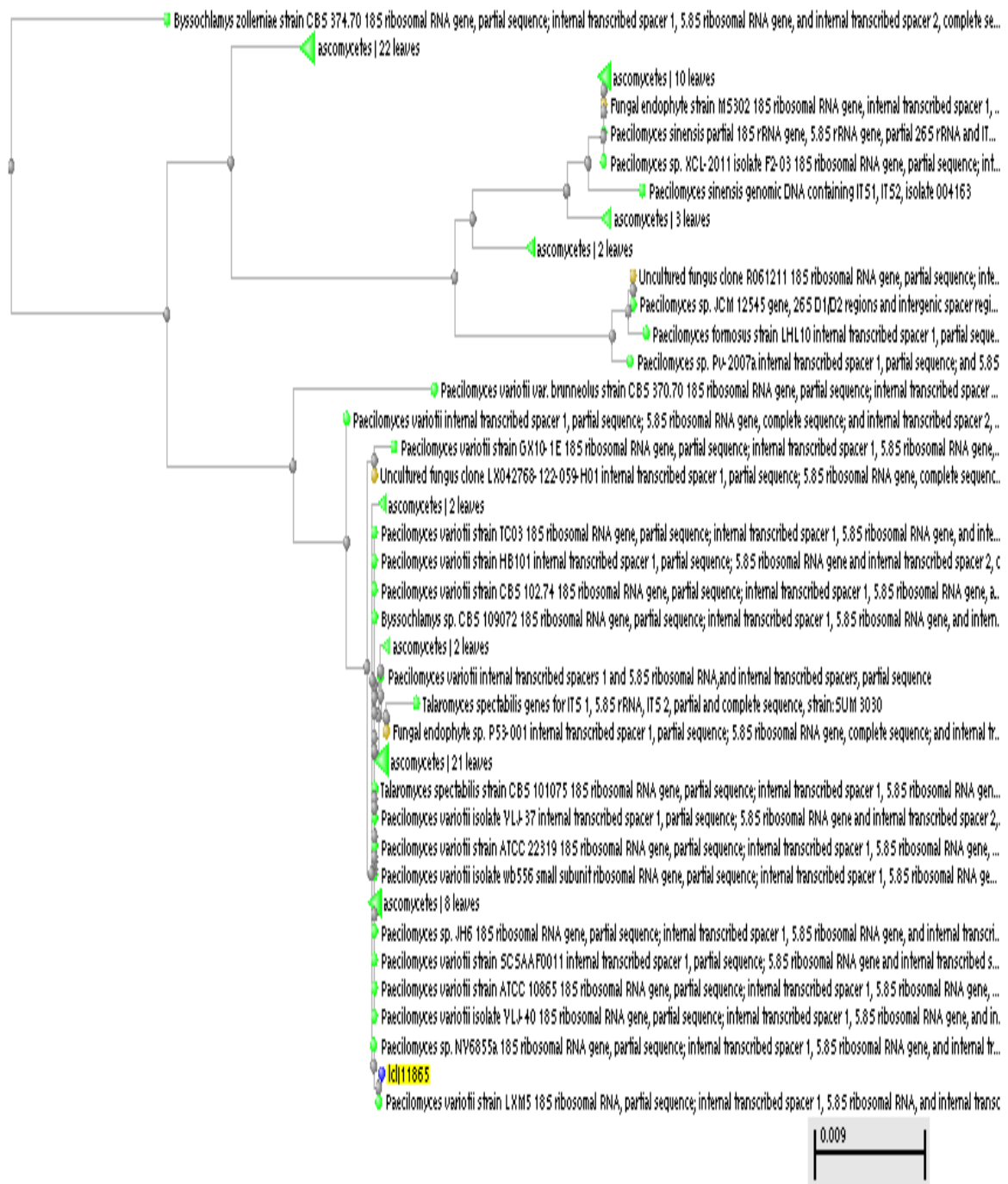


Imagen n° 9. Árbol filogenético de *P. variotii* (Icl|11865).

### 5.1.1.2.2. Secuenciación del fragmento correspondiente a P2-ITS4

El aislado P2 ha sido identificado gracias al alineamiento de las secuencias mediante la base de datos del NCBI, recibiendo el número de abcesión JX231004. Esto nos ha permitido conocer que existe un 98 de homología entre P2 y *P. variotii* (Imagen nº 10 y 11).

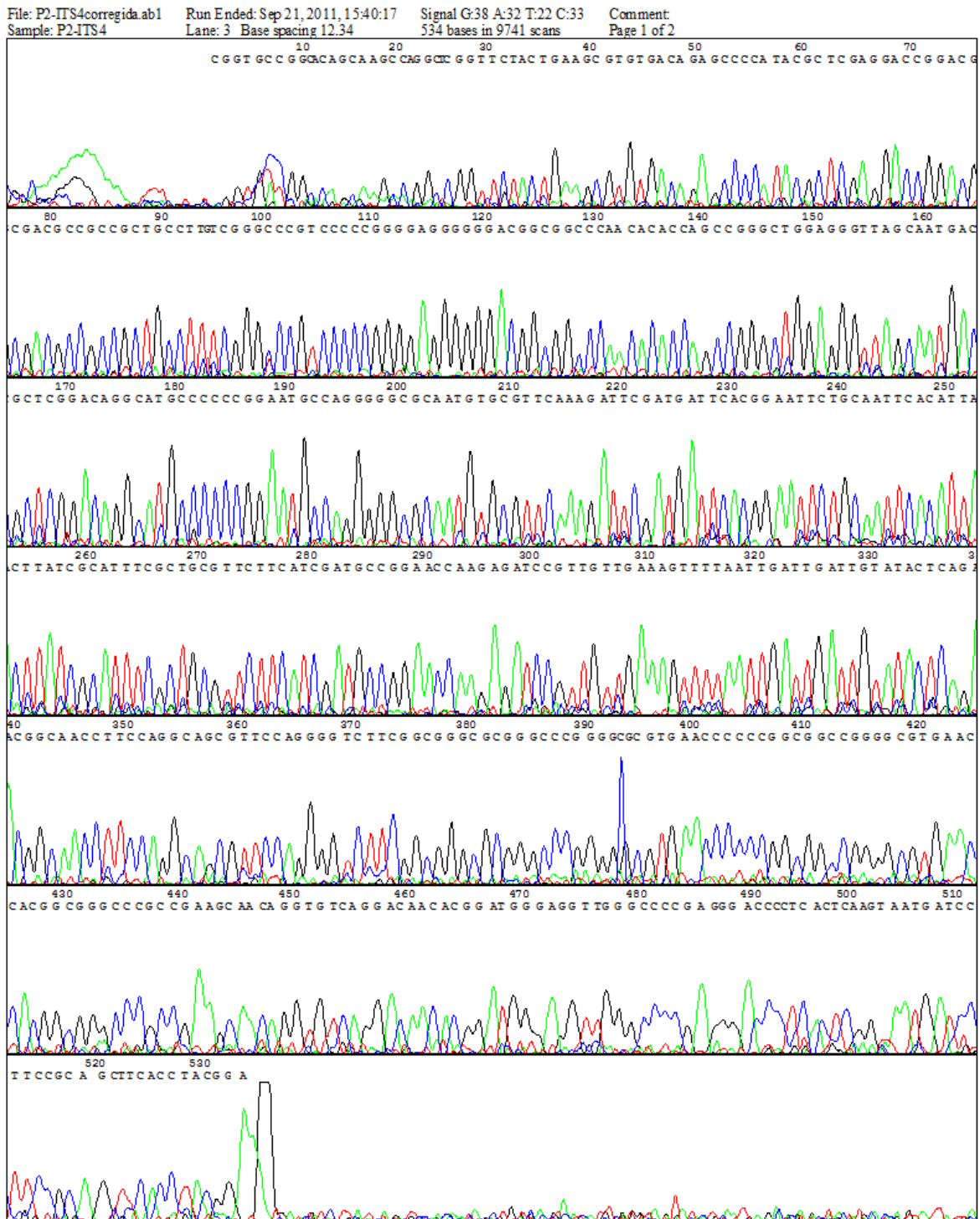


Imagen nº 10. Secuenciación del fragmento ITS4 correspondiente al aislado P2.

Query ID |cl|59627 Database Name nr  
 Description None Description Nucleotide collection (nt)  
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.2.27+ [Citation](#)  
 Query Length 534

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

**Graphic Summary**

**Descriptions**

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">JX282326.1</a>	Paecilomyces variotii internal transcribed spacers 1 and 5.8S ribosomal RN	<a href="#">913</a>	913	92%	0.0	100%	
<a href="#">JX231004.1</a>	Paecilomyces variotii isolate YLJ-40 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	<a href="#">909</a>	909	98%	0.0	98%	
<a href="#">JQ796880.1</a>	Paecilomyces variotii strain TC03 18S ribosomal RNA gene, partial sequen	<a href="#">909</a>	909	98%	0.0	98%	
<a href="#">FJ345354.1</a>	Paecilomyces variotii strain ATCC 10865 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">909</a>	909	98%	0.0	98%	
<a href="#">AY373941.1</a>	Paecilomyces variotii strain ATCC 22319 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">909</a>	909	98%	0.0	98%	
<a href="#">GU966517.1</a>	Paecilomyces variotii strain XSBN13 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	<a href="#">904</a>	904	98%	0.0	98%	
<a href="#">GQ386857.1</a>	Paecilomyces sp. JH6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	<a href="#">904</a>	904	98%	0.0	98%	
<a href="#">FJ487938.1</a>	Paecilomyces variotii strain GX10-1E 18S ribosomal RNA gene, partial seq	<a href="#">904</a>	904	98%	0.0	98%	
<a href="#">AF455416.1</a>	Paecilomyces variotii isolate wb556 small subunit ribosomal RNA gene, par	<a href="#">896</a>	896	98%	0.0	98%	
<a href="#">HM626196.1</a>	Paecilomyces sp. ALAS-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inte	<a href="#">891</a>	891	98%	0.0	98%	
<a href="#">JX231002.1</a>	Paecilomyces variotii isolate YLJ-37 internal transcribed spacer 1, partial	<a href="#">889</a>	889	95%	0.0	98%	

Imagen n° 11. Alineamiento de la secuencia ITS4 del aislado P2 en la base de datos del NCBI.

Podemos observar la similitud entre las secuencias del ADNr del aislado P2 y *P. variotii*:

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
909 bits(492)	0.0	515/525(98%)	8/525(1%)	Plus/Minus	
Query	8	GGCACAGCAAGCCAGGCTCGGTTCTACTGAAGCGTGTGACAGAGCCCCATACGCTCGAGG			67
Sbjct	544	GGC-CAGCAAGCC-GGC-CGGTTCCTACTGAAGCGTGTGACAGAGCCCCATACGCTCGAGG			488
Query	68	ACCGGACGCGACGCCGCCGCTGCCTTGTCTGGGCCCCGTCCCCGGGGAGGGGGACGGCGG			127
Sbjct	487	ACCGGACGCGACGCCGCCGCTGCCTT-TCGGGCCCCGTCCCCGGGGAGGGGGACGGCGG			429
Query	128	CCCAACACACCAGCCGGGCTGGAGGGTTAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGG			187
Sbjct	428	CCCAACACACCAGCCGGGCTGGAGGGTTAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGG			369
Query	188	AATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCA			247
Sbjct	368	AATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCA			309
Query	248	CATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTT			307
Sbjct	308	CATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTT			249
Query	308	GAAAGTTTAAATTGATTGATTGTATACTCAGACGGCAACCTTCCAGGCAGCGTTCCAGGG			367
Sbjct	248	GAAAGTTTAAATTGATTGATTGTATACTCAGACGGCAACCTTCCAGGCAGCGTTCCAGGG			189



Query	368	GTCTTcggcggggcgcgggcccggggcgcggtgaacccccggcgggcgggcggtgaaccac	427
Sbjct	188	GTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGG-GCGTGAACCCCCGCGGCCGGGGCGTGAACCAC	130
Query	428	ggcggggcccgccgAAGCAACAGGTGTCAGGACAACACGGATGGGAGGTTGGGCCCCGAGG	487
Sbjct	129	GGCGGGCCCGCCGAAGCAACAGGTGTCAGGACAACACGGATGGGAGGTTGGGCCCCGAGG	70
Query	488	GACCCCTACTCAAGTAATGATCCTTCCGCANGCTTCACCTACGG	532
Sbjct	69	GACCC-TCACTCG-GTAATGATCCTTCCGCAGG-TTCACCTACGG	28

Las especies más próximas a *P. variotii* con localizador (Icl|59627) son las siguientes (Imagen n° 12):

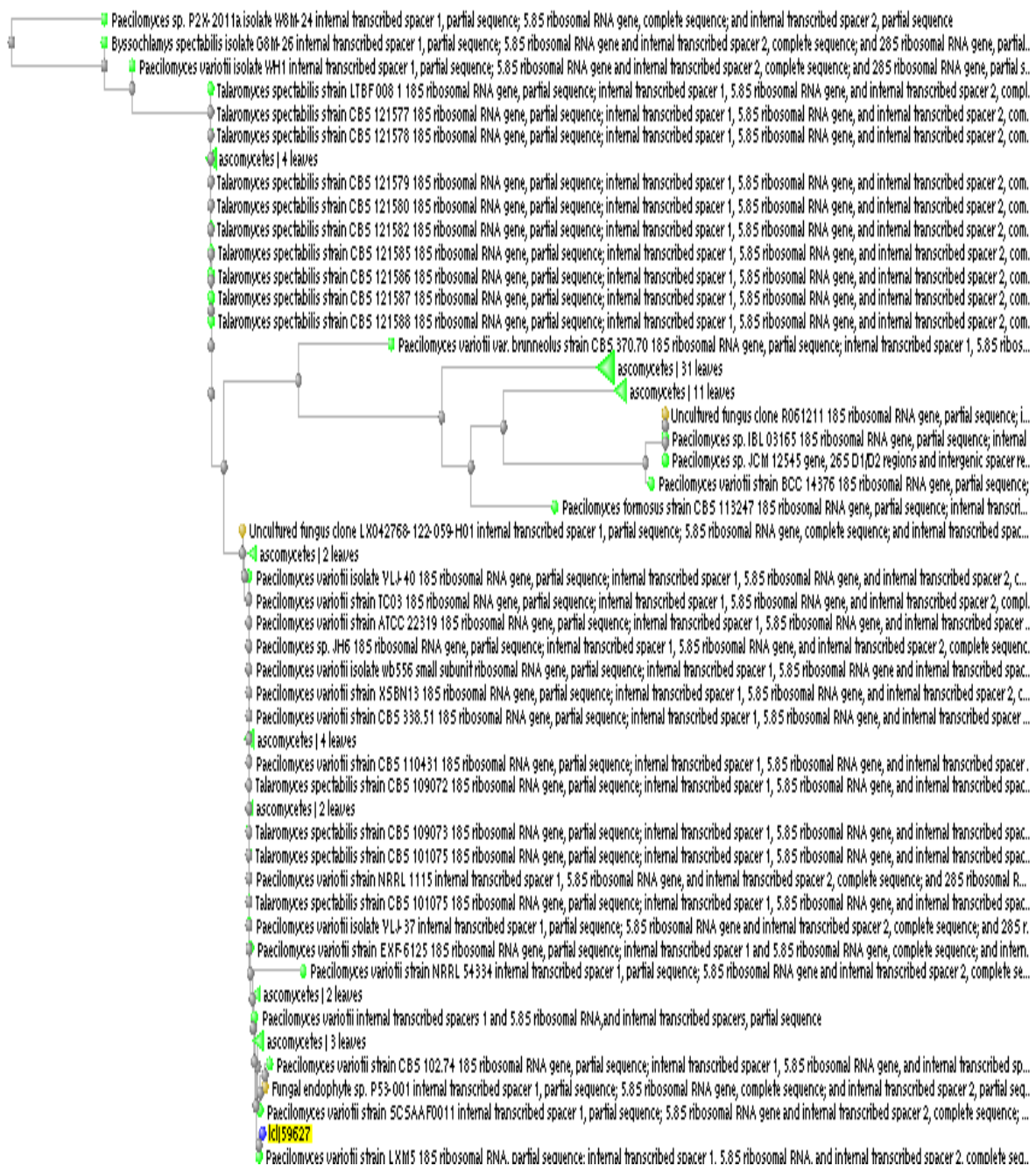


Imagen n° 12. Árbol filogenético de *P. variotii* (Icl|59627).

### 5.1.1.2.3. Secuenciación del fragmento correspondiente a P3-ITS4

La secuencia del fragmento de ADN correspondiente al aislado P3 (Imagen n° 13) ha sido introducida en la base de datos del NCBI, pudiendo así ser comparada con otras secuencias ya conocidas. El alineamiento de la secuencia muestra una homología del 98% entre P3 y *P. variotii* (Imagen n° 14).

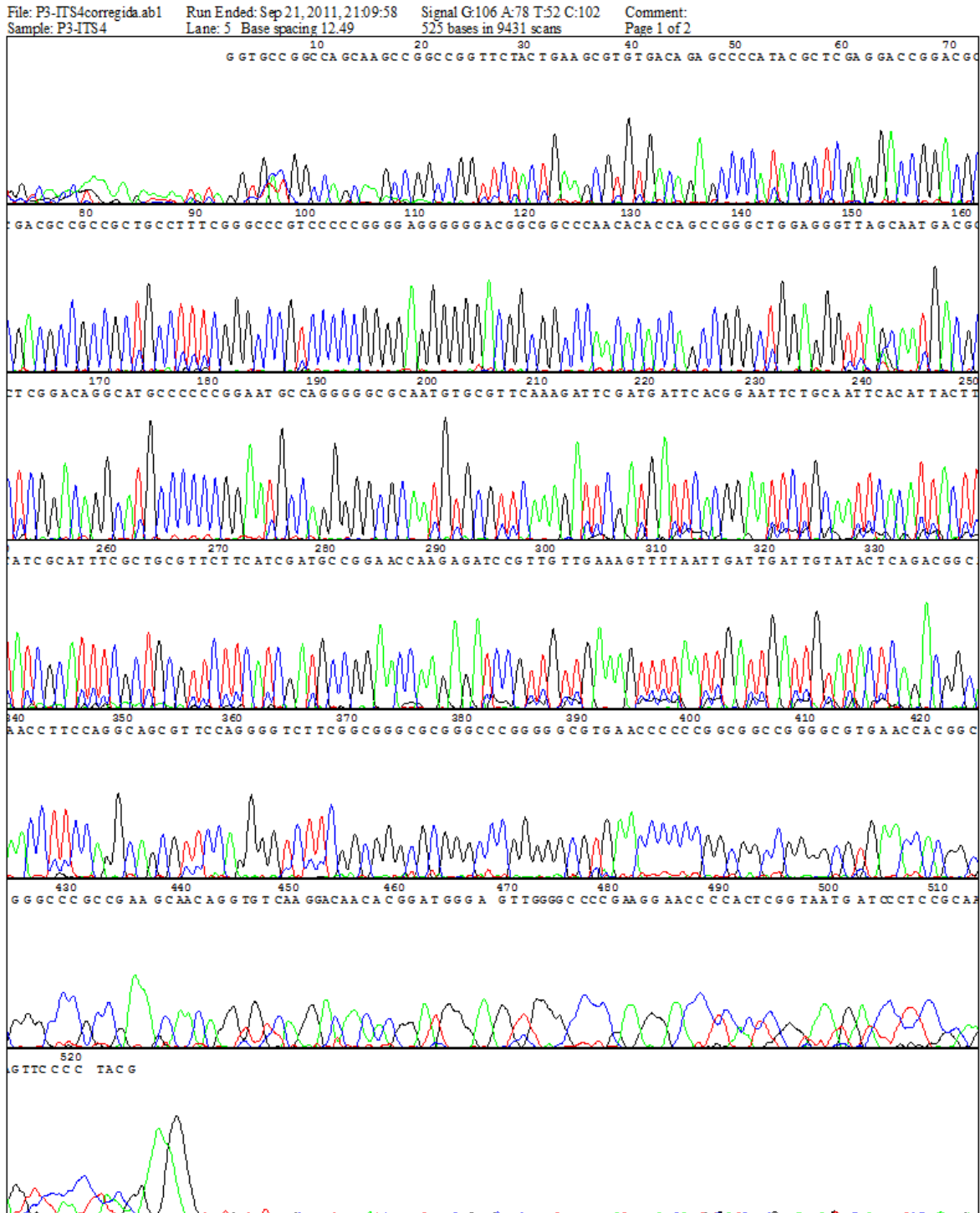


Imagen n° 13. Secuenciación del fragmento ITS4 correspondiente al aislado P3.



Query ID: [|](#)43755 Database Name: nr  
 Description: None Description: Nucleotide collection (nt)  
 Molecule type: nucleic acid Program: BLASTN 2.2.27+ [|](#)[Citation](#)  
 Query Length: 525

Other reports: [|](#) Search Summary [|](#) Taxonomy reports [|](#) Distance tree of results

**Graphic Summary**

**Descriptions**

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">GQ386857.1</a>	Paecilomyces sp. JH6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	905	905	98%	0.0	98%	
<a href="#">JX231004.1</a>	Paecilomyces variotii isolate YLJ-40 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	902	902	98%	0.0	98%	
<a href="#">JQ796880.1</a>	Paecilomyces variotii strain TC03 18S ribosomal RNA gene, partial sequen	902	902	98%	0.0	98%	
<a href="#">FJ345354.1</a>	Paecilomyces variotii strain ATCC 10865 18S ribosomal RNA gene, partial	902	902	98%	0.0	98%	
<a href="#">AY373941.1</a>	Paecilomyces variotii strain ATCC 22319 18S ribosomal RNA gene, partial	902	902	98%	0.0	98%	
<a href="#">AF455416.1</a>	Paecilomyces variotii isolate wb556 small subunit ribosomal RNA gene, par	898	898	97%	0.0	98%	
<a href="#">GU966517.1</a>	Paecilomyces variotii strain XSBN13 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	896	896	98%	0.0	98%	
<a href="#">FJ487938.1</a>	Paecilomyces variotii strain GX10-1E 18S ribosomal RNA gene, partial seq	896	896	98%	0.0	98%	
<a href="#">JX231002.1</a>	Paecilomyces variotii isolate YLJ-37 internal transcribed spacer 1, partial	891	891	96%	0.0	98%	
<a href="#">FR718456.1</a>	Paecilomyces sp. BF029 genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5,	889	889	95%	0.0	99%	
<a href="#">GU968674.1</a>	Paecilomyces variotii strain DTO 63F5 18S ribosomal RNA gene, partial se	889	889	95%	0.0	99%	
<a href="#">FJ389930.1</a>	Paecilomyces variotii strain CBS 338.51 18S ribosomal RNA gene, partial s	889	889	95%	0.0	99%	
<a href="#">EU037055.1</a>	Paecilomyces variotii strain CBS 102.74 18S ribosomal RNA gene, partial s	889	889	95%	0.0	99%	

Imagen n° 14. Alineamiento de la secuencia ITS4 del aislado P3 en la base de datos del NCBI.

La homología que presenta el aislado P3 con *P. variotii* se comprueba en la siguiente secuencia:

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
902 bits(488)	0.0	509/519(98%)	3/519(0%)	Plus/Minus	
Query	7	GGCCAGCAAGCCGGCCGGTTC	ACTGAAAGCGTGTGACAGAGCC	CATACGCTCGAGGACC	66
Sbjct	544	GGCCAGCAAGCCGGCCGGTTC	ACTGAAAGCGTGTGACAGAGCC	CATACGCTCGAGGACC	485
Query	67	GGACGCGACGCCGCCGCTGCCT	TTTCGGGCCCGTCCCCCGGG	AGGGGGACGGCGGCCCA	126
Sbjct	484	GGACGCGACGCCGCCGCTGCCT	TTTCGGGCCCGTCCCCCGGG	AGGGGGACGGCGGCCCA	425
Query	127	ACACACCAGCCGGGCTGGAGGG	TTAGCAATGACGCTCGGACAGG	CATGCCCCCGGAATG	186
Sbjct	424	ACACACCAGCCGGGCTGGAGGG	TTAGCAATGACGCTCGGACAGG	CATGCCCCCGGAATG	365
Query	187	CCAGGGGGCGCAATGTGCGTT	CAAAGATTTCGATGATTCACG	GAATTCTGCAATTCACATT	246
Sbjct	364	CCAGGGGGCGCAATGTGCGTT	CAAAGATTTCGATGATTCACG	GAATTCTGCAATTCACATT	305
Query	247	ACTTATCGCATTTTCGCTGCGT	TCTTCATCGATGCCGGAACCA	AGATCCGTTGTTGAAA	306
Sbjct	304	ACTTATCGCATTTTCGCTGCGT	TCTTCATCGATGCCGGAACCA	AGATCCGTTGTTGAAA	245

Query	307	GTTTTAATTGATTGATTGTATACTCAGACGGCAACCTTCCAGGCAGCGTTCCAGGGGTCT	366
Sbjct	244	GTTTTAATTGATTGATTGTATACTCAGACGGCAACCTTCCAGGCAGCGTTCCAGGGGTCT	185
Query	367	Tcggcggggcgcggggcccgggggcgtgaacccccggcgccggggcgtgaaccaaggcgg	426
Sbjct	184	TCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGCGTGAACCCCCGGCGGCCGGGGCGTGAACCACGGCGG	125
Query	427	gcccgccgAAGCAACAGGTGTCAAGGACAACACGGATGGGANGTTGGGGCCCCGAAGGAA	486
Sbjct	124	GCCCGCCGAAGCAACAGGTGTCA-GGACAACACGGATGGGAGGTTGGG-CCCCGAGGGAC	67
Query	487	CCCCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAAGTTCCCCNTACG	525
Sbjct	66	CCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAAGTTCCACC-TACG	29

En el árbol filogenético puede observarse las especies y aislados de *Paecilomyces* sp. que se encuentran más próximas a *P. variotii* con localizador (lcl|43755) (Imagen n° 15).

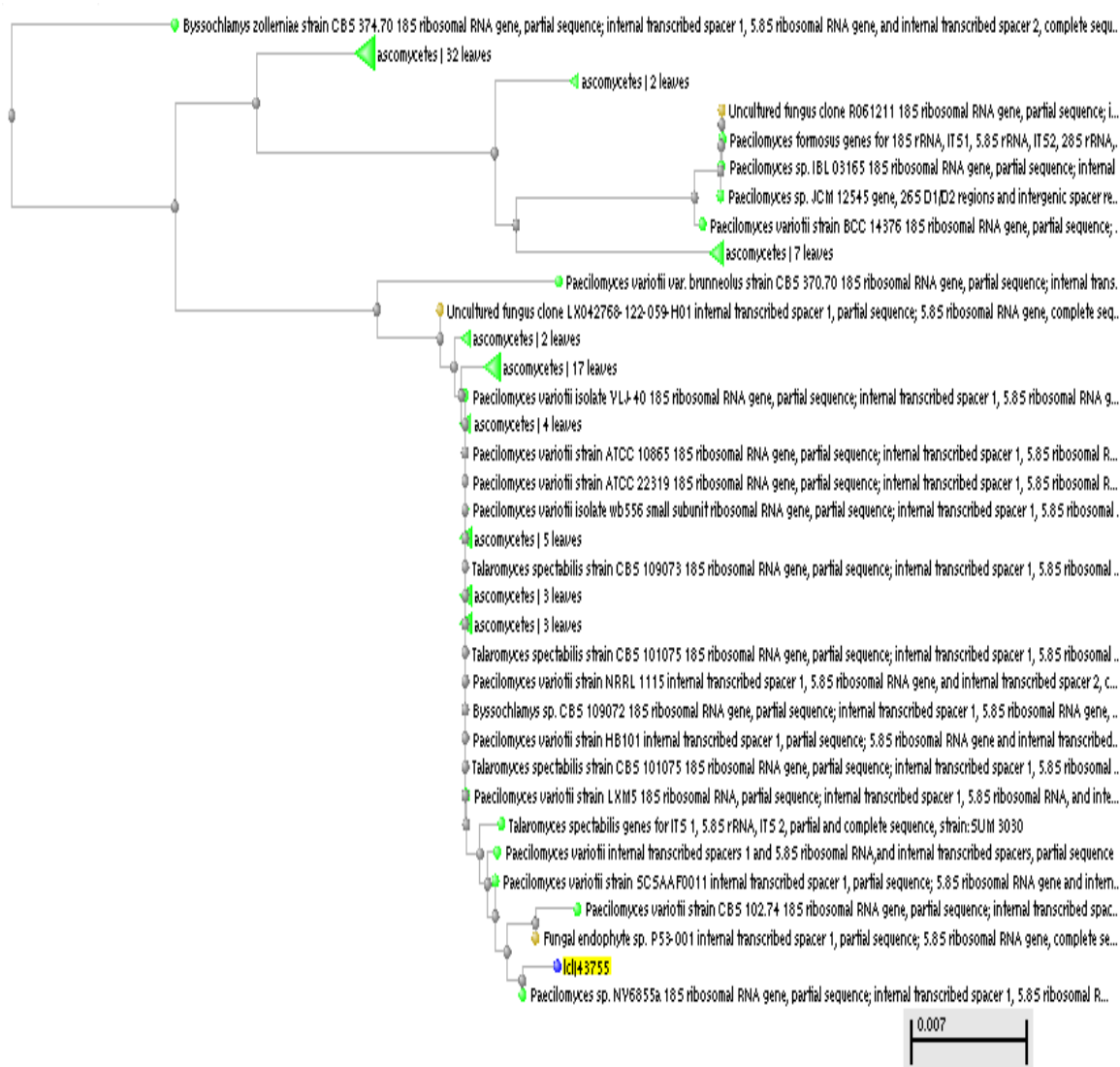


Imagen n° 15. Árbol filogenético de *P. variotii* (lcl|43755).

#### 5.1.1.2.4. Secuenciación del fragmento correspondiente a P4-ITS4

La secuencia del fragmento de ADN correspondiente al aislado P4 (Imagen n° 16) y el alineamiento de dichas secuencias en la base de datos muestra una alta homología con *P. variotii* (98%), adjudicándosele un número de abcesión JX231004 (Imagen n° 17).

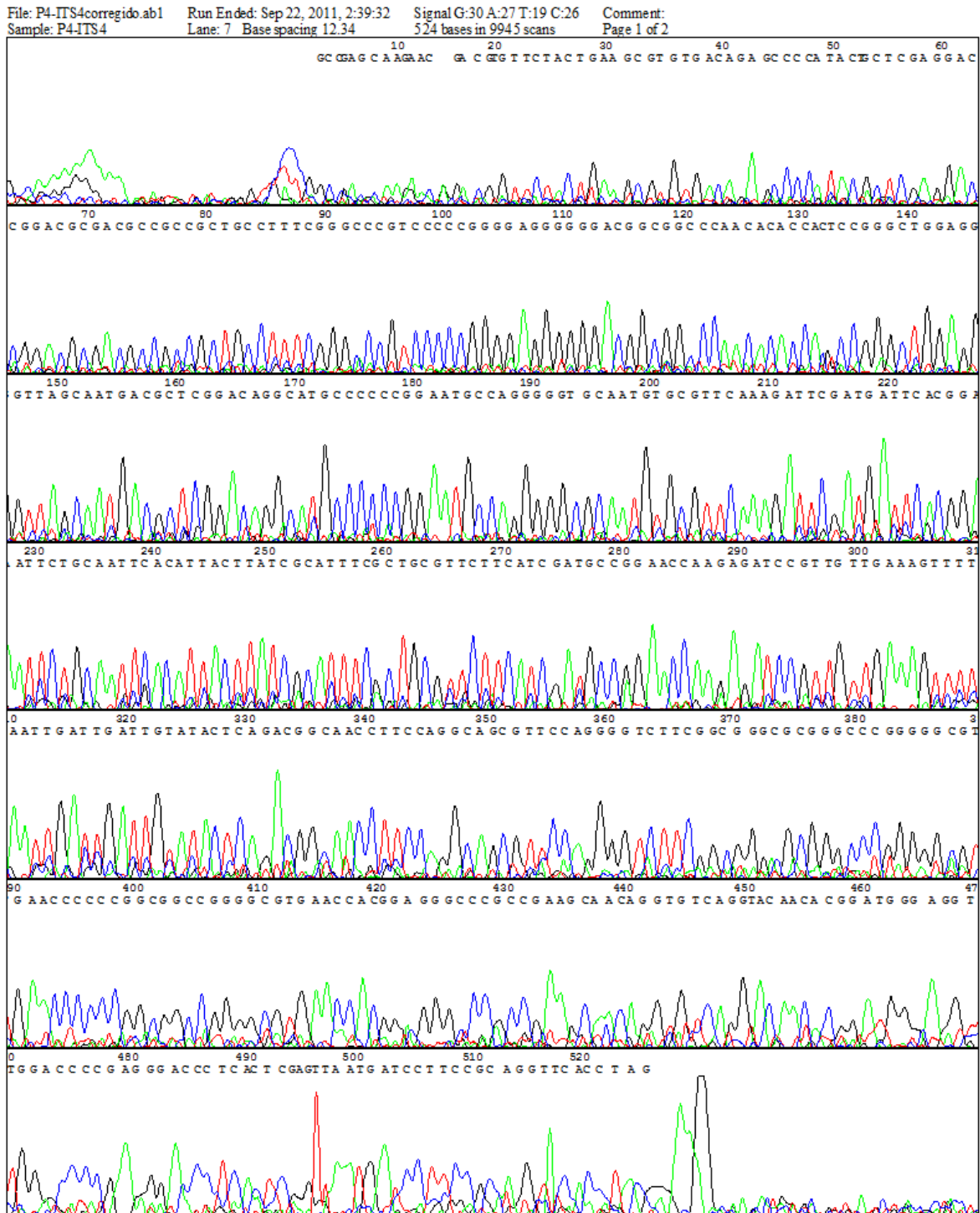


Imagen n° 16. Secuenciación del fragmento ITS4 correspondiente al aislado P4.

Query ID |d|2963 Database Name nr  
 Description None Description Nucleotide collection (nt)  
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.2.27+ [Citation](#)  
 Query Length 524

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

[Graphic Summary](#)

[Descriptions](#)

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">JX231004.1</a>	Paecilomyces variotii isolate YLJ-40 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	<a href="#">863</a>	863	96%	0.0	98%	
<a href="#">JQ796880.1</a>	Paecilomyces variotii strain TC03 18S ribosomal RNA gene, partial sequen	<a href="#">863</a>	863	96%	0.0	98%	
<a href="#">FJ345354.1</a>	Paecilomyces variotii strain ATCC 10865 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">863</a>	863	96%	0.0	98%	
<a href="#">AY373941.1</a>	Paecilomyces variotii strain ATCC 22319 18S ribosomal RNA gene, partial	<a href="#">863</a>	863	96%	0.0	98%	
<a href="#">GQ386857.1</a>	Paecilomyces sp. JH6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	<a href="#">859</a>	859	95%	0.0	98%	
<a href="#">GU966517.1</a>	Paecilomyces variotii strain XSBN13 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	<a href="#">857</a>	857	96%	0.0	98%	
<a href="#">FJ487938.1</a>	Paecilomyces variotii strain GX10-1E 18S ribosomal RNA gene, partial seq	<a href="#">857</a>	857	96%	0.0	98%	
<a href="#">JX231002.1</a>	Paecilomyces variotii isolate YLJ-37 internal transcribed spacer 1, partial	<a href="#">852</a>	852	94%	0.0	98%	
<a href="#">AF455416.1</a>	Paecilomyces variotii isolate wb556 small subunit ribosomal RNA gene, par	<a href="#">852</a>	852	95%	0.0	98%	
<a href="#">HM626196.1</a>	Paecilomyces sp. ALAS-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inte	<a href="#">845</a>	845	96%	0.0	97%	
<a href="#">AY753330.1</a>	Talaromyces spectabilis strain CBS 101075 18S ribosomal RNA gene, parti	<a href="#">843</a>	843	93%	0.0	98%	

Imagen n° 17. Alineamiento de la secuencia ITS4 del aislado P4 en la base de datos del NCBI.

La homología que presenta el aislado P4 con *P. variotii* se comprueba en la siguiente secuencia:

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
863 bits (467)	0.0	493/504 (98%)	7/504 (1%)	Plus/Minus
Query 20	GTTCTACTGAAGCGTGTGACAGAGCCCCATACTGCTCGAGGACCGGACGCGACGCCGCCG			79
Sbjct 527	GTTCTACTGAAGCGTGTGACAGAGCCCCATAC-GCTCGAGGACCGGACGCGACGCCGCCG			469
Query 80	CTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCGGGGAGGGGGACGGCGGCCCAACACACCACTCCGGGC			139
Sbjct 468	CTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCGGGGAGGGGGACGGCGGCCCAACACACCA-GCCGGGC			410
Query 140	TGGAGGGTTAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCCGGAATGCCAGGGGGTGAATG			199
Sbjct 409	TGGAGGGTTAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATG			350
Query 200	TGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCCG			259
Sbjct 349	TGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCCG			290
Query 260	CTGCGTTCCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATTGATTGA			319
Sbjct 289	CTGCGTTCCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATTGATTGA			230

Query	320	TTGTATACTCAGACGGCAACCTTCCAGGCAGCGTTCCAGGGGTCTTcggcgggcgcgggc	379
Sbjct	229	TTGTATACTCAGACGGCAACCTTCCAGGCAGCGTTCCAGGGGTCTTCGGCGGGCGCGGGC	170
Query	380	ccggggcgctgaaccccccgggcgccggggcgTGAACCACGGAGGGCCCGCCGAAGCAAC	439
Sbjct	169	CCGGGGGCGTGAACCCCCGGCGGCCGGGGCGTGAACCACGGCGGGCCCGCCGAAGCAAC	110
Query	440	AGGTGTCAGGTACAACACGGATGGGNAGGTTGGACCCCGAGGGACCTCACTCGAGTTAA	499
Sbjct	109	AGGTGTCAGG-ACAACACGGATGGG-AGGTTGGGCCCCGAGGGACCTCACTCG-GT-AA	54
Query	500	TGATCCTTCCGCNAGGTTACCTA	523
Sbjct	53	TGATCCTTCCGC-AGGTTACCTA	31

En el árbol filogenético se pueden observar las especies y aislados de más próximas a *P. variotii* con localizador (Ic|2963) (Imagen nº 18).

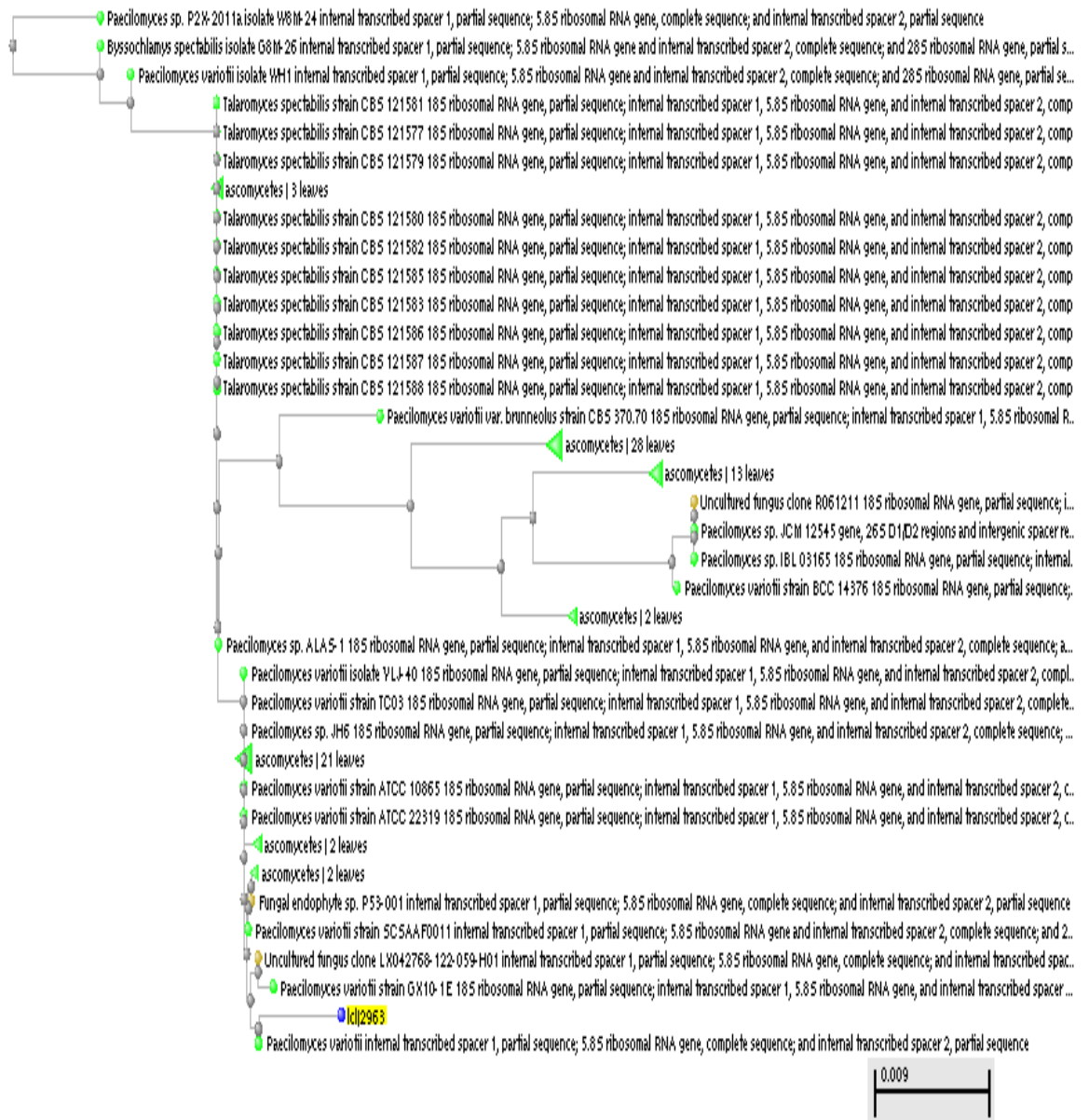


Imagen nº 18. Árbol filogenético de *P. variotii* (Ic|2963).

### 5.1.1.3. Resumen de la identificación específica

El siguiente cuadro (Cuadro n° 3) muestra un resumen de los datos obtenidos en el estudio de identificación de aislados, donde puede observarse a qué especie de hongo pertenece cada aislado.

Aislado	Especie
T1	<i>T. saturnisporum</i>
T2	<i>T. saturnisporum</i>
P1	<i>P. variotii</i>
P2	<i>P. variotii</i>
P3	<i>P. variotii</i>
P4	<i>P. variotii</i>

**Cuadro n° 3.** Resumen de los resultados de la identificación específica.

Según la base de datos del NCBI, los dos aislados del género *Trichoderma*, T1 y T2, pertenecen a la misma especie, *Trichoderma. saturnisporum*. Lo mismo ocurre con los cuatro aislados del género *Paecilomyces*, los cuales pertenecen a la especie, *Paecilomyces variotii*.

### 5.1.2. Estudio de la variabilidad genética de los aislados

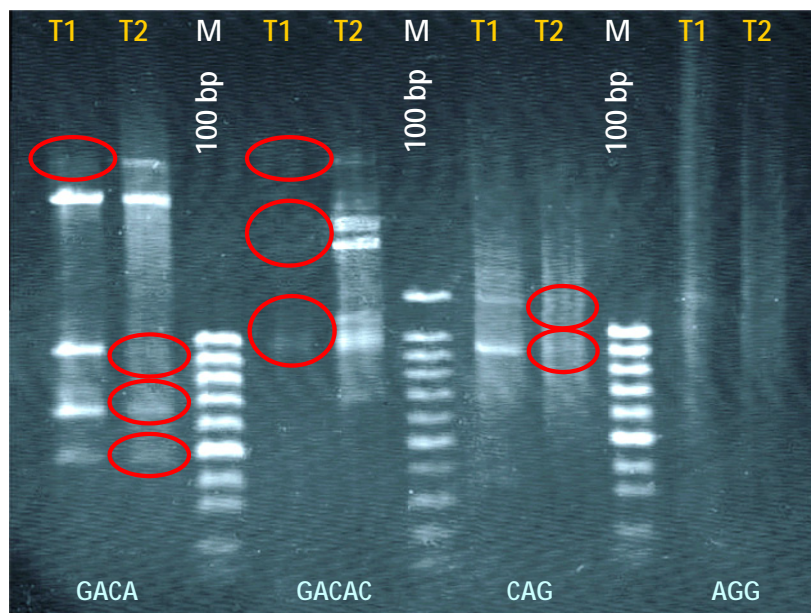
La RAPD-PCR permite conocer la pequeña variabilidad genética existente entre los diversos aislados analizados. Debido al pequeño tamaño de los cebadores utilizados en esta técnica, éstos se unen a lugares no específicos del ADN y muestran las diferencias existentes entre diferentes cepas de una misma especie.

En las siguientes figuras (Figura n° 9 y 10) puede observarse los patrones de bandas obtenidos mediante electroforesis de los productos de la RAPD-PCR, tras una tinción en bromuro de etidio y visualización en un captador de geles. Las elipses de color rojo señalan



las diferencias observadas entre las bandas, ya sea en distribución o en intensidad de éstas, de los distintos aislados analizados.

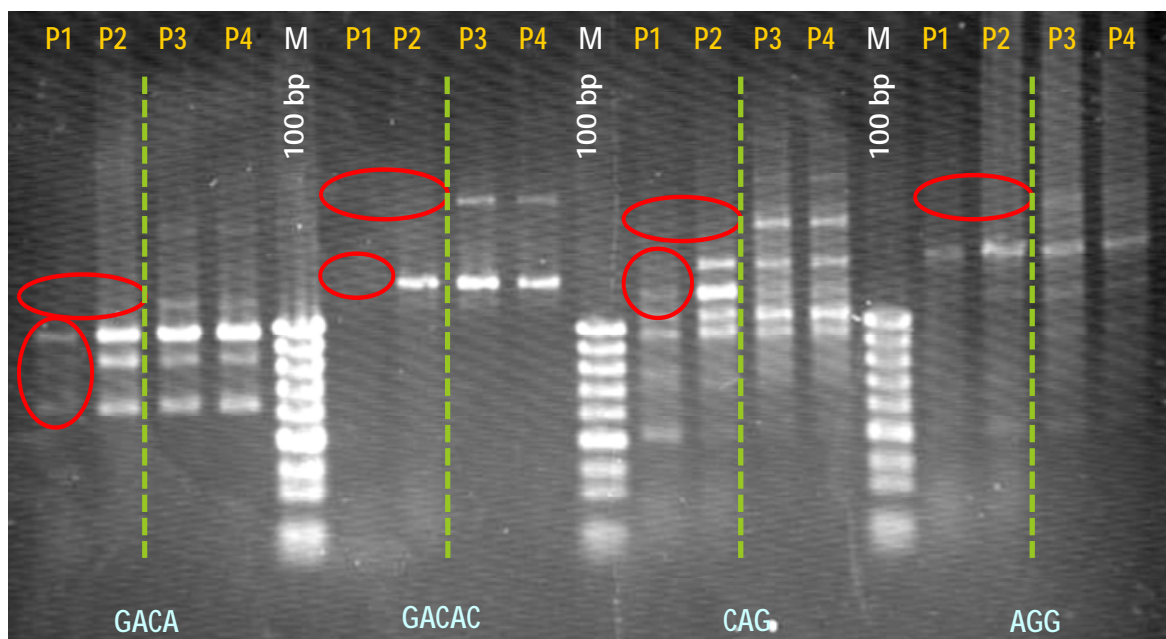
### 5.1.2.1. Variabilidad genética de los aislados del género *Trichoderma*



**Figura n° 9.** Visualización de los productos de la RAPD-PCR para los aislados del género *Trichoderma*.

Para el cebador GACA, los patrones de bandas de ambos aislados de *T. saturnisporum* presentan bastantes semejanzas, aunque encontramos ciertas bandas donde las intensidades para ambos varían, siendo más intensas para el aislado T1. Los patrones de bandas para el cebador GACAC son los que presentan mayores diferencias, ya que, aunque la mayoría de bandas parecen ser comunes en ambas, las bandas del aislado T1 tiene una intensidad casi inapreciable. Para los cebadores CAG y AGG, los patrones de bandas de ambos aislados son similares aunque la mayoría de bandas del aislado T1 son más intensas (Figura n° 9).

### 5.1.2.2. Variabilidad genética de los aislados del género *Paecilomyces*



**Figura nº 10.** Visualización de los productos de la RAPD-PCR para los aislados del género *Paecilomyces*.

Como puede observarse en la figura anterior (Figura nº 10), los aislados P3 y P4 muestran un patrón de bandas idéntico para todos los cebadores utilizados, incluso todas las bandas presentan la misma intensidad.

En cambio, los patrones de bandas de los aislados P1 y P2 presentan diferencias entre sí y entre el resto de aislados.

El aislado P2 presenta un patrón de bandas casi idéntico a P3 y P4 para el cebador GACA, CAG y AGG, observando alguna diferencia en cuanto a la falta de alguna banda de poco peso, siendo las posteriores similares en distribución e intensidad. El patrón del cebador CAG del aislado P2 es el que presenta más diferencias en relación a los P3 y P4, observándose la presencia de nuevas bandas no presentes en estos últimos. Los patrones de bandas del aislado P1 para todos los cebadores presentan diferencias significativas con respecto al resto de aislado de *P. variotii*. La distribución de las bandas es similar pero la intensidad de éstas difieren notablemente, siendo la mayoría de menor intensidad comparadas con el resto de aislados, llegando incluso a no existir bandas para el cebador GACAC.



## 5.2. EFECTO ANTAGONISTA DE LOS METABOLITOS NO VOLÁTILES

A continuación se exponen los resultados obtenidos en el ensayo de evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados seleccionados para este estudio.

Para ello, se ha representado el porcentaje de inhibición final del crecimiento de los ocho fitopatógenos citados anteriormente en el apartado 3.3. frente a cada microorganismo antagonista. Para representar los % de inhibición se han realizado dos gráficas, una para cada género de hongos, colocando en el eje de abscisas los aislados seleccionados para el ensayo y en el eje de ordenadas el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno frente al antagonista en cuestión. La proporción de extracto utilizado en cada tratamiento viene indicado por las letras (a, b, c, d) situadas en el eje de abscisas, donde: a = 5%; b = 10%, c = 25%; d = 50%.

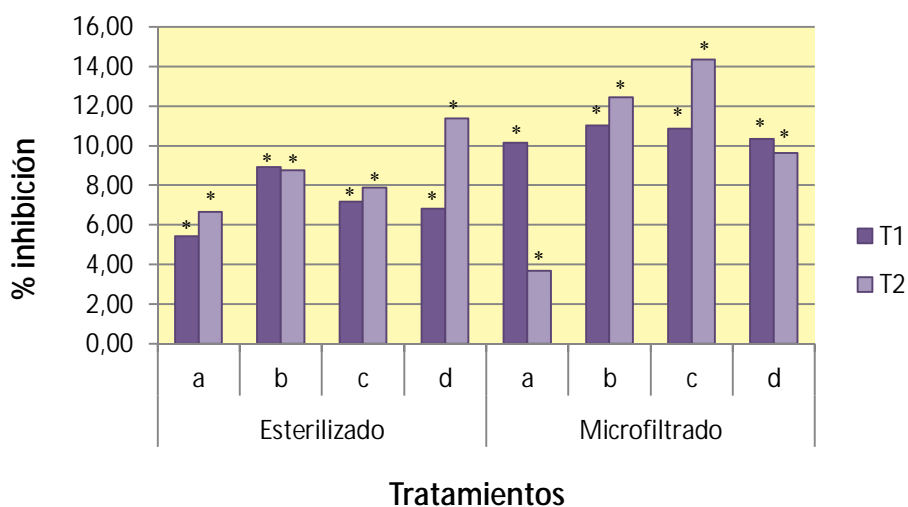
Además, se ha representado, mediante un diagrama lineal, la evolución temporal del crecimiento micelial de cada fitopatógeno, en el cual se dispone en el eje de abscisas los días transcurridos tras la inoculación del patógeno o días después de la siembra (DDS), mientras que en el eje de ordenadas se observa el crecimiento del patógeno medido en centímetros (cm). Las primeras letras de la leyenda (E, MF) hacen referencia al tipo de procesado realizado al extracto (E = esterilizado, MF = microfiltrado). La siguiente letra (A, B, C, D) designa la concentración de extracto utilizado en el medio de cultivo (A = 5%, B = 10%, C = 25%, D = 50%).

Las barras marcadas con \* indican la existencia de diferencia significativa con respecto al testigo (a nivel de confianza LSD 95%) en el análisis estadístico realizado a los datos mediante ANOVA SIMPLE con el programa StatGraphics® Centurion XV.

## 5.2.1. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a *F. o. f. sp. niveum*

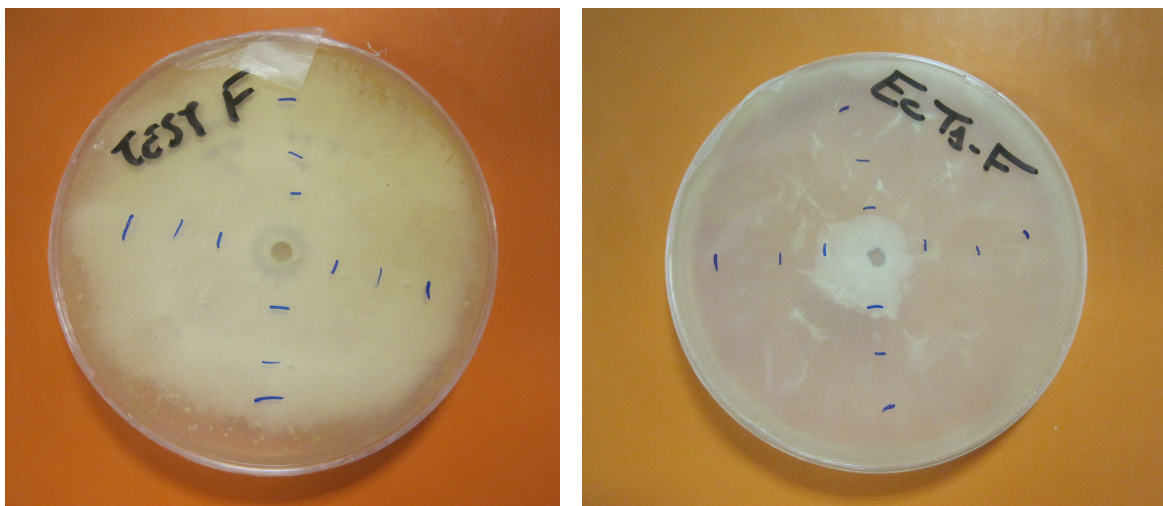
### 5.2.1.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial *in vitro*

#### 5.2.1.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* frente dos aislados de *T. saturnisporum*



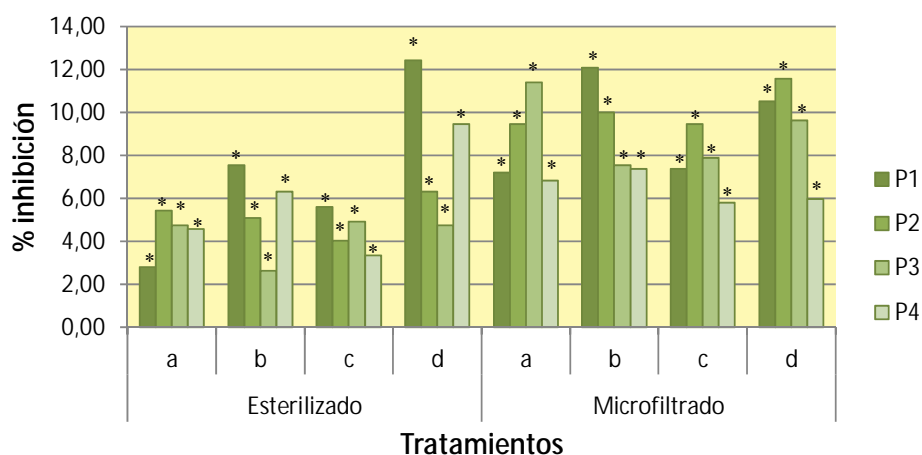
**Gráfica n° 1.** % de inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* frente a dos cepas de *T. saturnisporum*.

El efecto antagonista de los metabolitos de los aislados del género *Trichoderma* frente a *F. o. f. sp. niveum* alcanza valores aceptables de inhibición. El % de inhibición del crecimiento micelial ronda el 8% para los tratamientos con extracto esterilizado (Foto n° 3), siendo la inhibición algo superior en los tratamientos microfiltrados, los cuales alcanzan cotas de inhibición del 10-12%, incluso del 14%. Hay que tener en cuenta que durante el proceso de esterilización es posible que ciertos metabolitos no termoestables y con efecto antagonista se degraden, por lo que los tratamientos microfiltrados muestran un mayor % de inhibición. En cambio, la concentración de extracto utilizada parece no tener apenas relevancia. Todos los tratamientos presentan diferencias significativas con respecto al testigo, según ANOVA SIMPLE.



**Foto n° 3.** Crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* sobre PDA con un 25% de extracto esterilizado del aislado T1 comparado con el testigo.

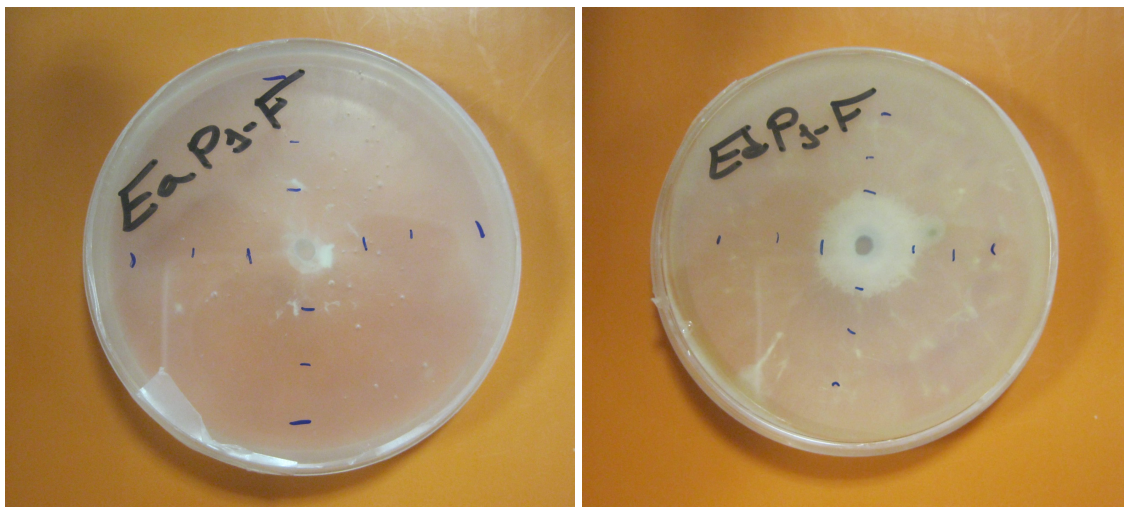
#### 5.2.1.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* frente a cuatro aislados de *P. variotii*



**Gráfica n° 2.** % de inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* frente a cuatro cepas de *P. variotii*.

En general, los aislados seleccionados del género *Paecilomyces* han mostrado unos % de inhibición frente a *F. o. f. sp. niveum* no superiores al 8-10% (Foto n° 4), aunque todos ellos han mostrado diferencias significativas según ANOVA SIMPLE (LSD 95%). Un % de inhibición ligeramente superior ha mostrado el aislado P1, para el cual se ha registrado una inhibición del 12% (Foto n° 4). Los tratamientos microfiltrados han mostrado unos % de inhibición levemente mayores en comparación con los tratamientos

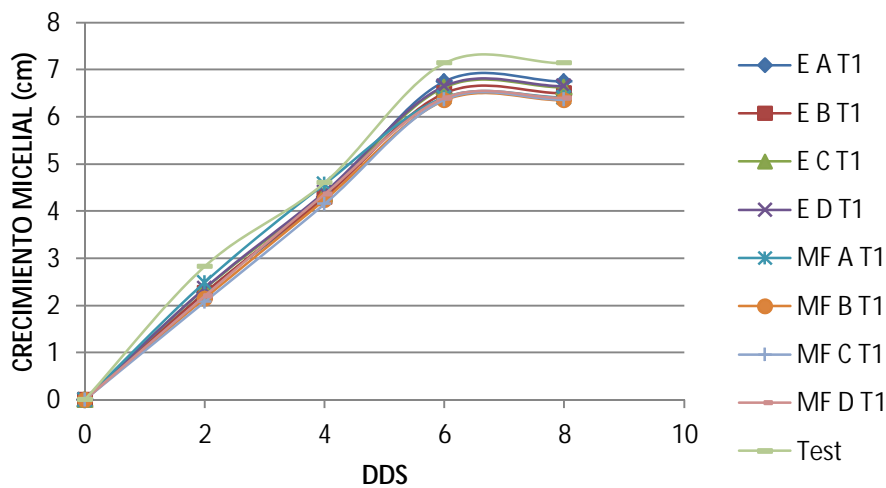
esterilizados. En cambio, apenas se observan diferencias de inhibición para las distintas concentraciones de extracto utilizadas.



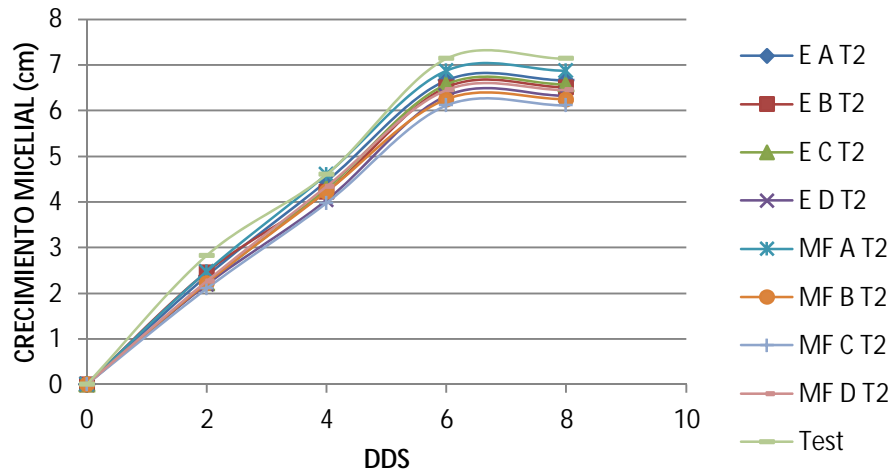
**Foto n° 4.** Crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* sobre PDA con un 5% y un 25% de extracto microfiltrado, respectivamente, del aislado P1 comparado con el testigo.

#### 5.2.1.2. Evolución del crecimiento micelial

##### 5.2.1.2.1. Evolución del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



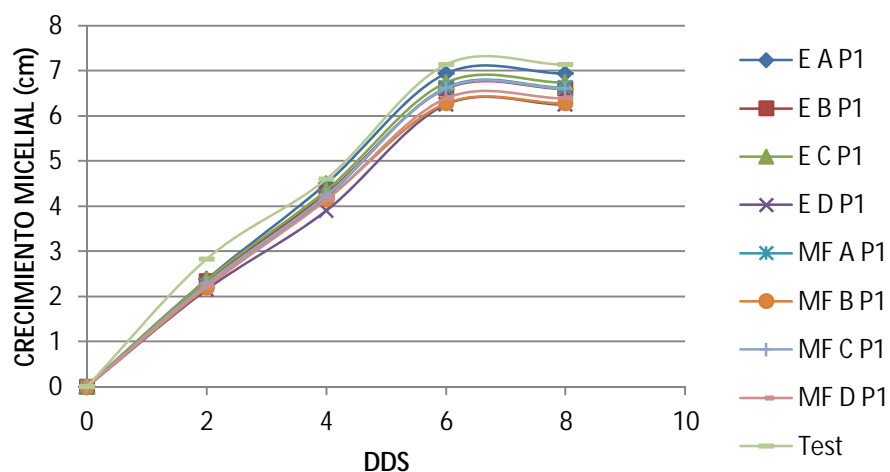
**Gráfica n° 3.** Crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* en PDA con diferentes tratamientos del aislado T1, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* (testigo) crecido en PDA.



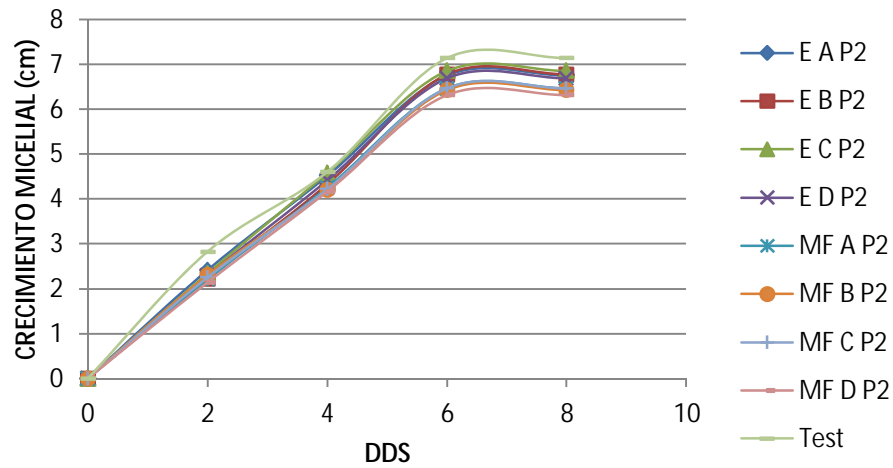
**Gráfica n° 4.** Crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* en PDA con diferentes tratamientos del aislado T2, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* (testigo) crecido en PDA.

El crecimiento micelial de *Fon* presenta una influencia moderada frente a las sustancias no volátiles producidas por los aislados T1 y T2. El efecto antagonista de los metabolitos se aprecia desde las primeras etapas del crecimiento del fitopatógeno.

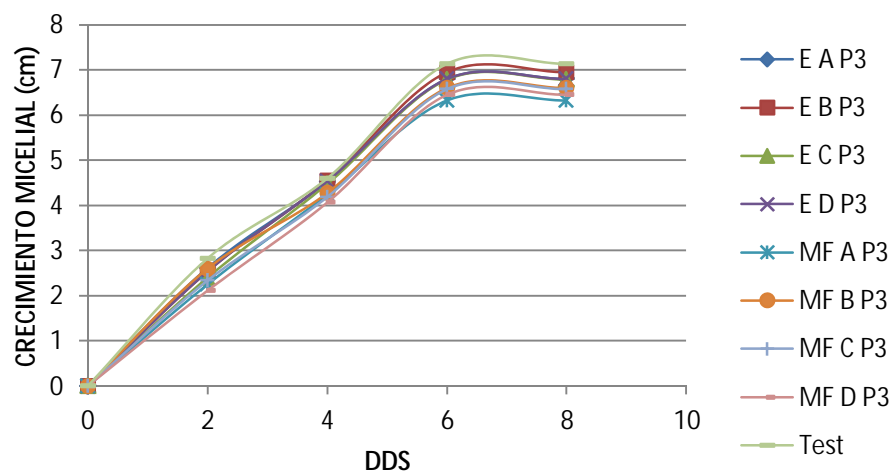
#### 5.2.1.2.2. Evolución del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* frente a cuatro aislados de *P. variotii*



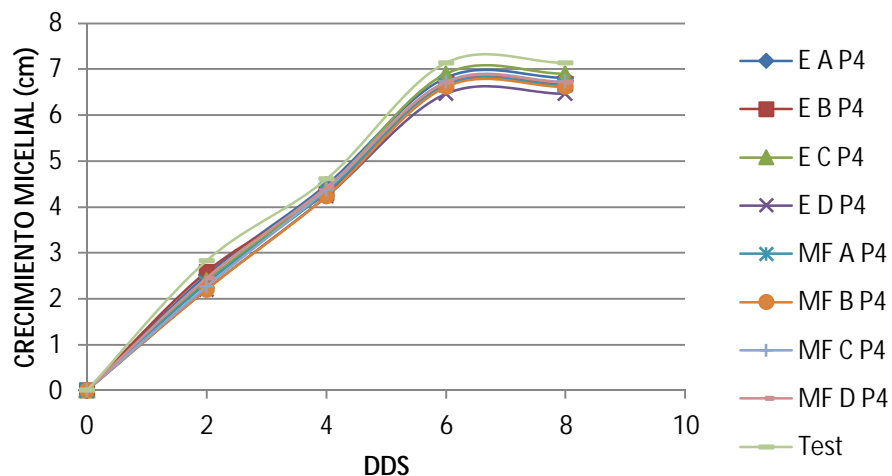
**Gráfica n° 5.** Crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P1, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 6.** Crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P2, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 7.** Crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P3, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* (testigo) crecido en PDA.



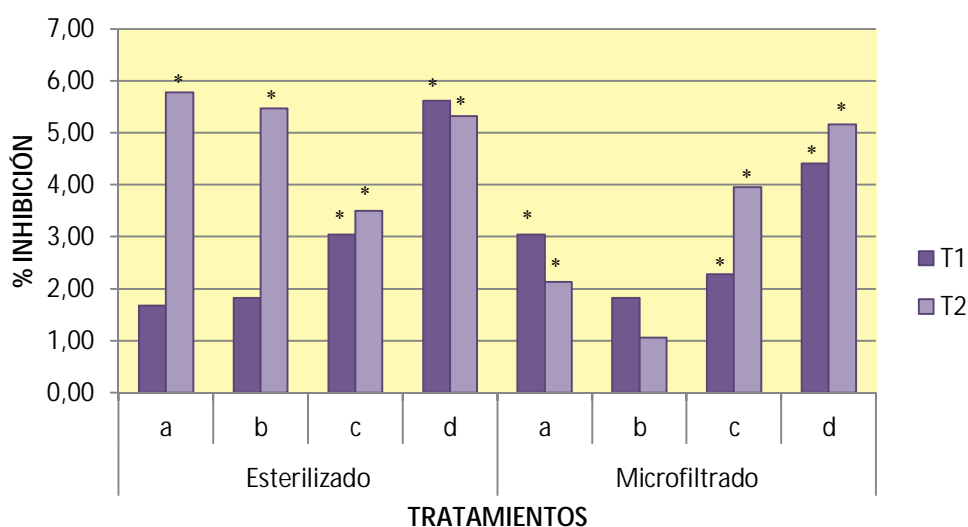
**Gráfica n° 8.** Crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P4, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* (testigo) crecido en PDA.

En general, el efecto inhibitorio mostrado por los aislados del género *Paecilomyces* frente a *F. oxysporum* f. sp. *niveum* ha sido moderado, presentándole aislado P1 unas tasas ligeramente superiores de inhibición.

## 5.2.2. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a *F. o. f. sp. lycopersici*

### 5.2.2.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial *in vitro*

#### 5.2.2.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*

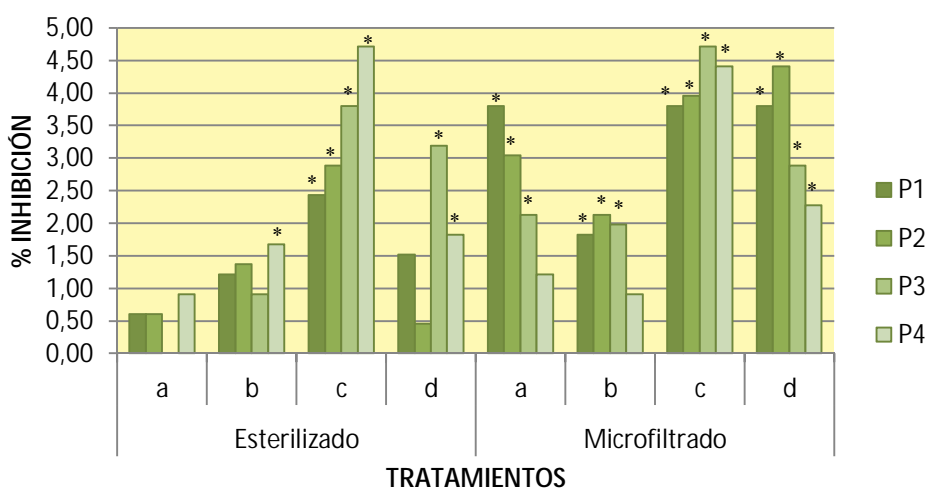


**Gráfica n° 9.** % de inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici* frente a dos cepas de *T. saturnisporum*.

El efecto antagonista de los metabolitos producidos por ambos aislados de *Trichoderma* frente a *F. o. f. sp. lycopersici* es muy leve, no superando en ningún caso el 6% de inhibición del crecimiento micelial. El aislado T2 produce cierta inhibición independientemente de la concentración en los tratamientos esterilizado, mostrándose en general más activo. En cambio, los % de inhibición de los tratamientos microfiltrados de T1 y T2 a bajas concentraciones apenas muestran inhibición. En general, se observan diferencias significativas con respecto al testigo según ANOVA SIMPLE en la mayoría de tratamientos.



### 5.2.2.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici* frente a cuatro aislados de *P. variotii*

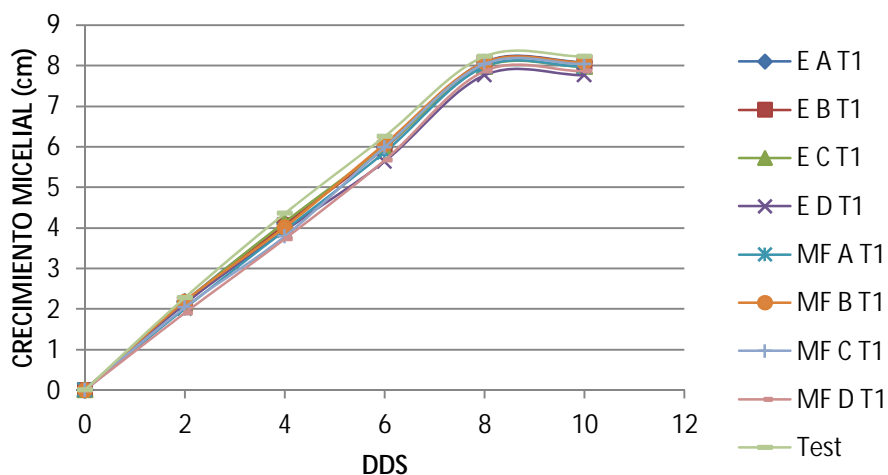


**Gráfica n° 10.** % de inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici* frente a cuatro cepas de *P. variotii*.

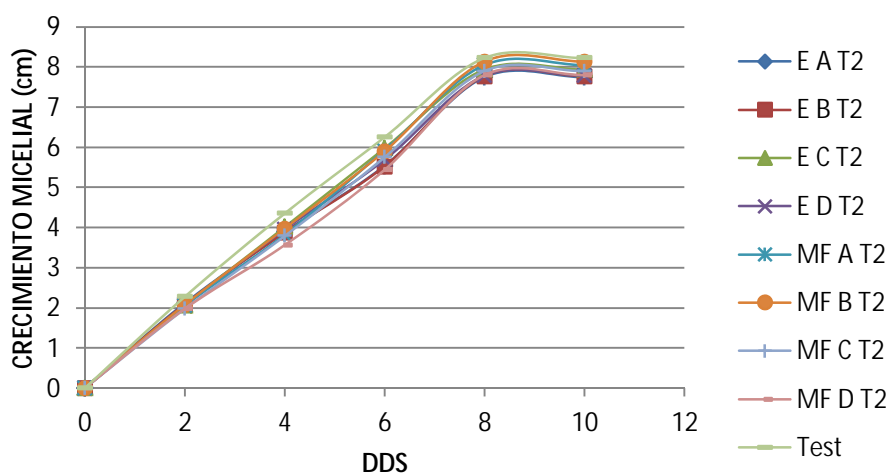
Los aislados seleccionados de *Paecilomyces* tienen un escaso poder inhibitorio sobre *F. o. f. sp. lycopersici*, ya que, incluso a altas concentraciones de extracto, el % de inhibición es inferior al 5%, aunque a medida que aumenta la concentración de extracto también aumentan los % de inhibición. La mayoría de los extractos microfiltrados presentan diferencias significativas con respecto al testigo (LSD 95%), no siendo así en los esterilizados, donde sólo algunos de los tratamientos a altas concentraciones muestran diferencias significativas.

### 5.2.2.2. Evolución del crecimiento micelial

#### 5.2.2.2.1. Evolución del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



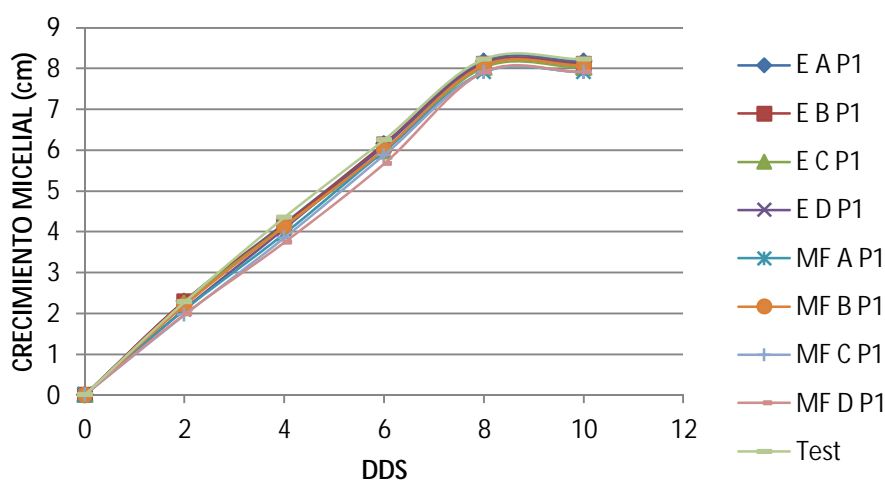
**Gráfica n° 11.** Crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* en PDA con diferentes tratamientos del aislado T1, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* (testigo) crecido en PDA.



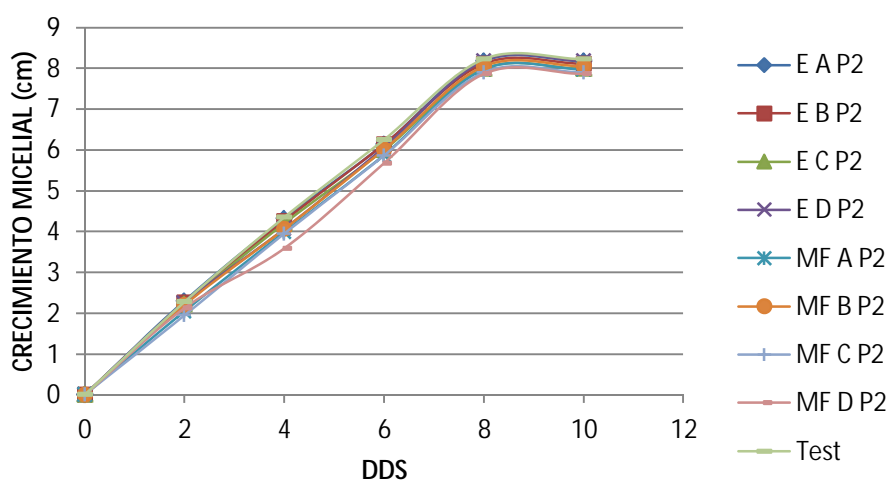
**Gráfica n° 12.** Crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* en PDA con diferentes tratamientos del aislado T2, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* (testigo) crecido en PDA.

Los metabolitos no volátiles procedentes de los aislados de *T. saturnisporum* seleccionadas para el ensayo presentan una influencia mínima en el crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici*.

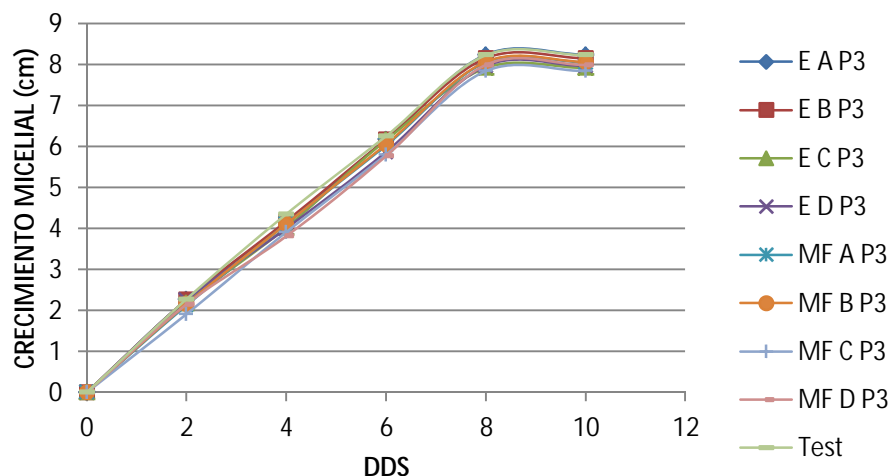
### 5.2.2.2. Evolución del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici* frente a cuatro aislados de *P. variotii*



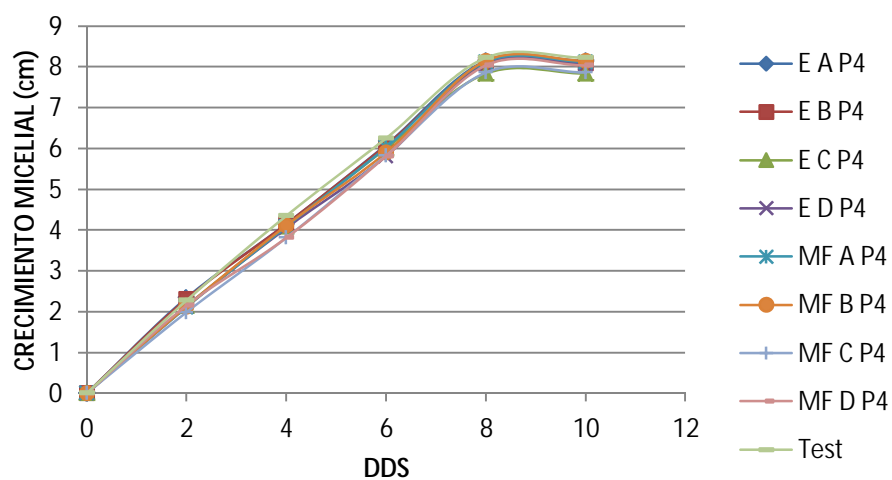
**Gráfica n° 13.** Crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P1, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 14.** Crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P2, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 15.** Crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P3, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* (testigo) crecido en PDA.



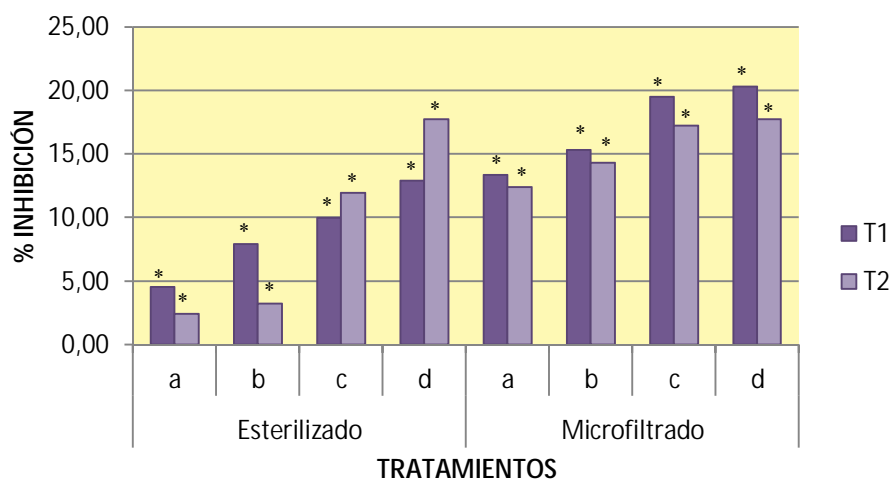
**Gráfica n° 16.** Crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P4, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* (testigo) crecido en PDA.

Ninguno de los aislados del género *Paecilomyces* seleccionados para este estudio provoca una inhibición aceptable sobre el crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici*.

### 5.2.3. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a *F. solani*

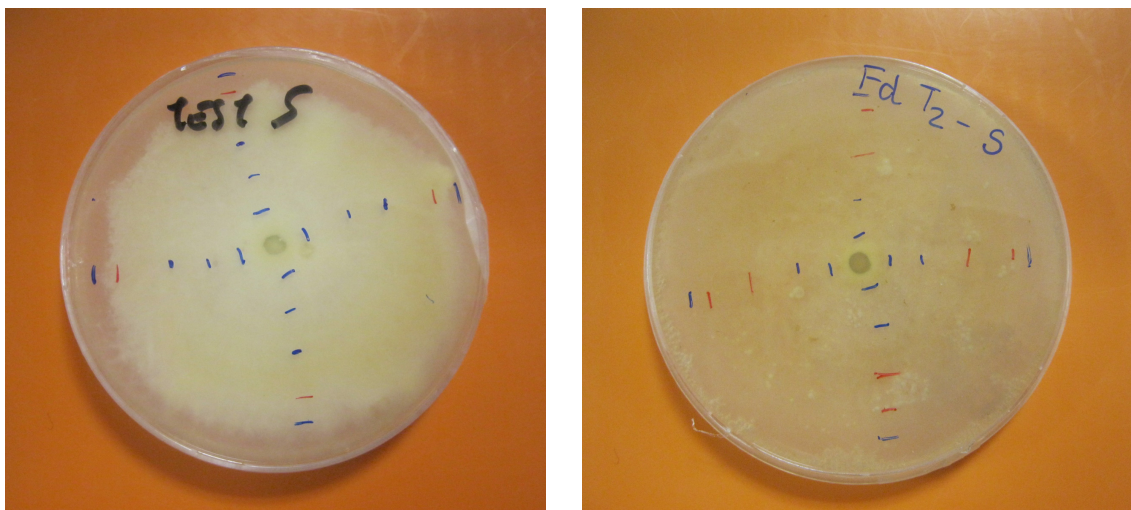
#### 5.2.3.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial *in vitro*

##### 5.2.3.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



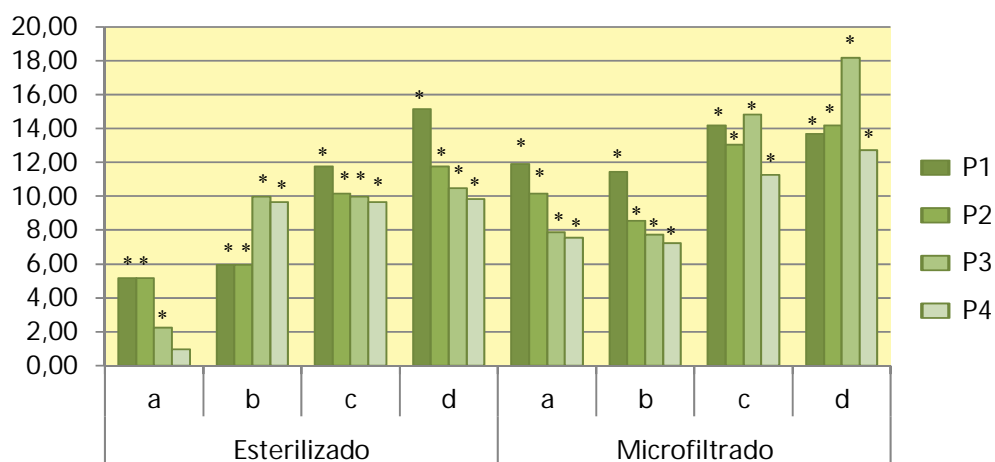
**Gráfica n° 17.** % de inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* frente a dos cepas de *T. saturnisporum*.

Ambos aislados muestran un aceptable % de inhibición, llegando a cotas del 20% en los tratamientos microfiltrados (Foto n° 5). Se puede observar como a mayor concentración de extracto aumenta el efecto inhibitorio sobre *F. solani*. Todos los tratamientos a base de extractos microfiltrados presentan una alta inhibición incluso a bajas concentraciones de extracto. La inhibición producida por los extractos esterilizados es ligeramente menor, y en los tratamientos a bajas concentraciones el efecto antagonista desciende de una forma más brusca. Esto puede deberse debido a que algunos metabolitos pueden no ser estables a las altas temperaturas alcanzadas en el autoclave. Todos los tratamientos presentan diferencias significativas según ANOVA SIMPLE con respecto al testigo.



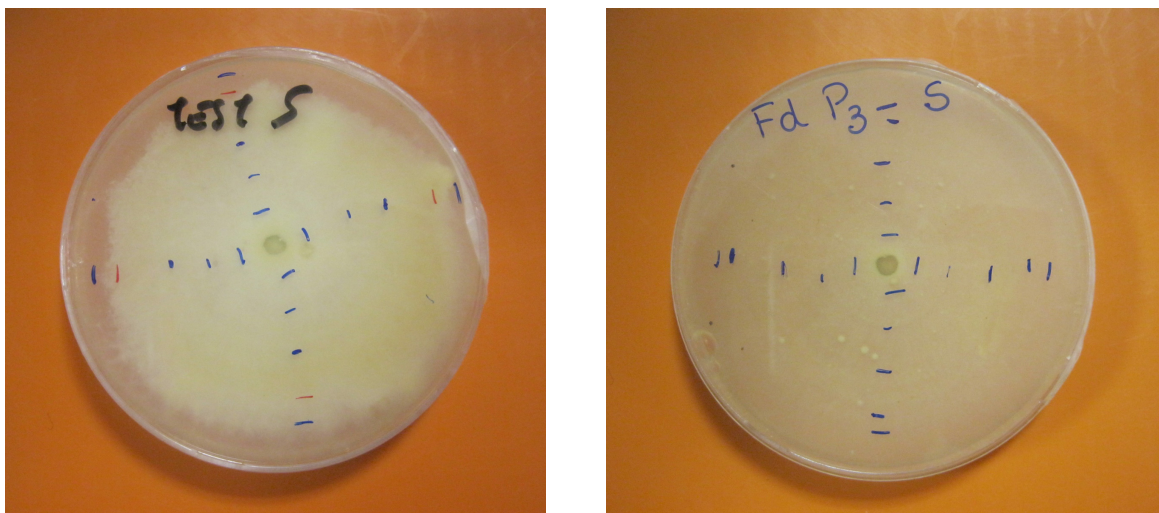
**Foto n° 5.** Crecimiento micelial de *F. solani* sobre PDA con un 50% de extracto microfiltrado del aislado T2 comparado con el testigo.

#### 5.2.3.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* frente a cuatro aislados de *P. variotii*



**Gráfica n° 18.** % de inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* frente a cuatro cepas de *P. variotii*.

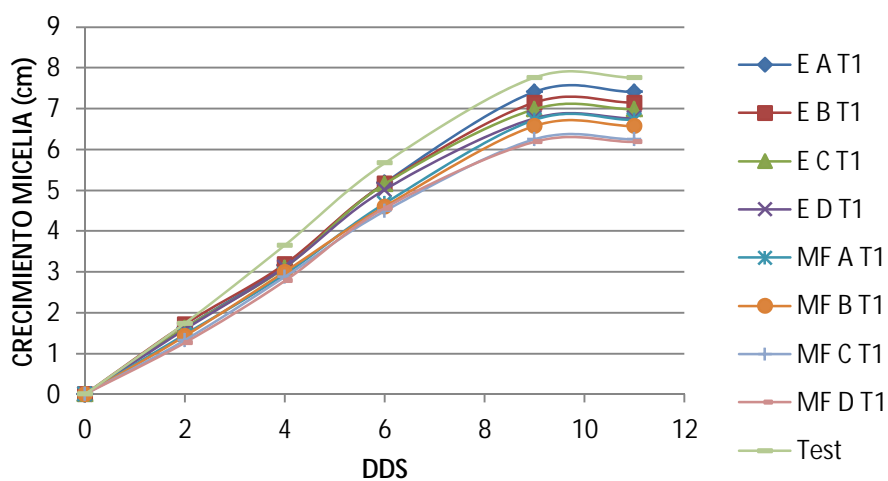
Los metabolitos no volátiles de todos los aislados del género *Paecilomyces* producen un moderado % de inhibición, que aumenta en función de la concentración de extracto utilizada. Así, para altos valores de concentración, los % de inhibición frente a *F. solani* rondan el 14% e incluso alcanzan el 18% para el aislado P3 (Foto n° 6). El aislado P1 provoca una inhibición notable incluso a bajas concentraciones. La inmensa mayoría de los tratamientos presenta diferencias significativas con respecto al testigo (LSD 95%).



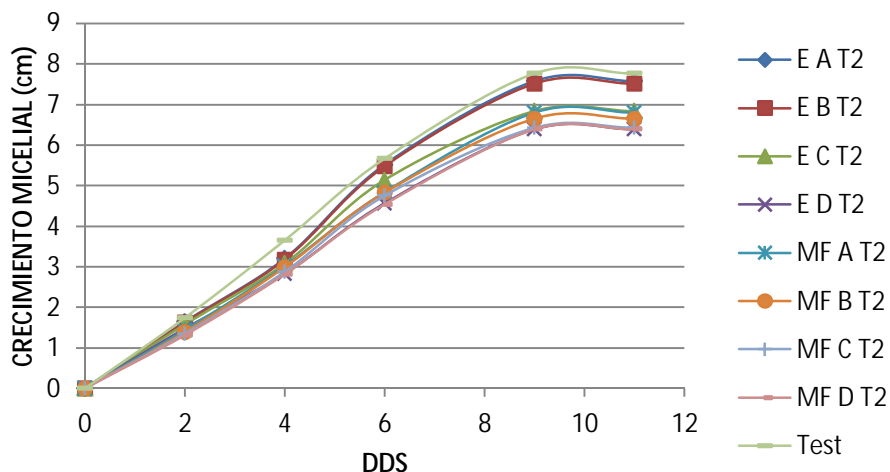
**Foto n° 6.** Crecimiento micelial de *F. solani* sobre PDA con un 50% de extracto microfiltrado del aislado P3 comparado con el testigo.

### 5.2.3.2. Evolución del crecimiento micelial

#### 5.2.3.2.1. Evolución del crecimiento micelial de *F. solani* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



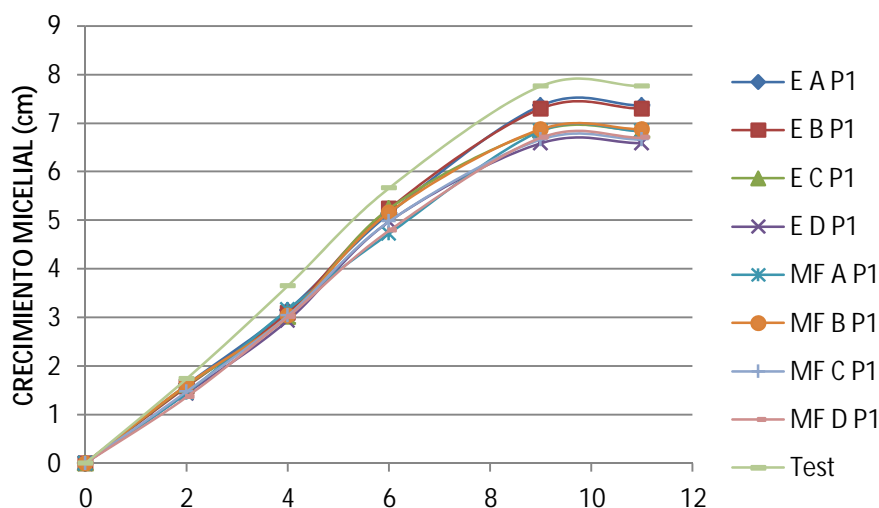
**Gráfica n° 19.** Crecimiento de *F. solani* en PDA con diferentes tratamientos del aislado T1, comparado con el crecimiento de *F. solani* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 20.** Crecimiento de *F. solani* en PDA con diferentes tratamientos del aislado T2, comparado con el crecimiento de *F. solani* (testigo) crecido en PDA.

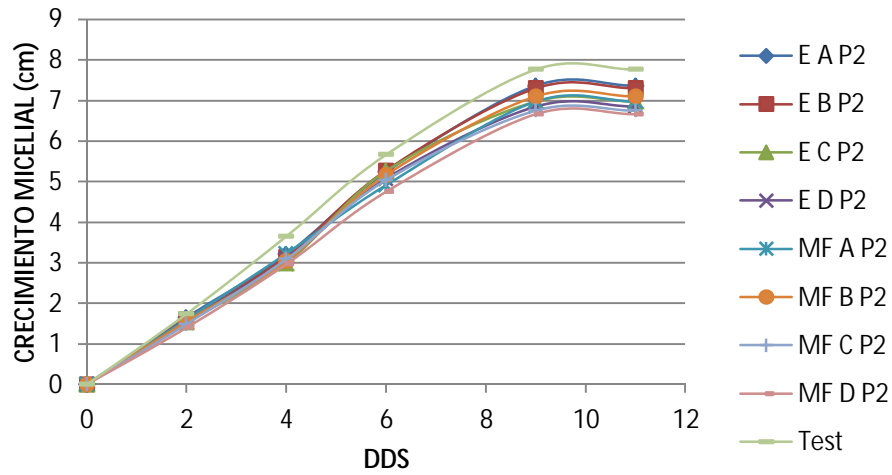
El crecimiento micelial de *F. solani* se ve afectado negativamente por la presencia en el medio de cultivo de metabolitos solubles. Tanto T1 como T2 ejercen un efecto antagonista moderado sobre el crecimiento *in vitro* de *Fs*.

#### 5.2.3.2.2. Evolución del crecimiento micelial de *F. solani* frente a cuatro aislados de *P. variotii*

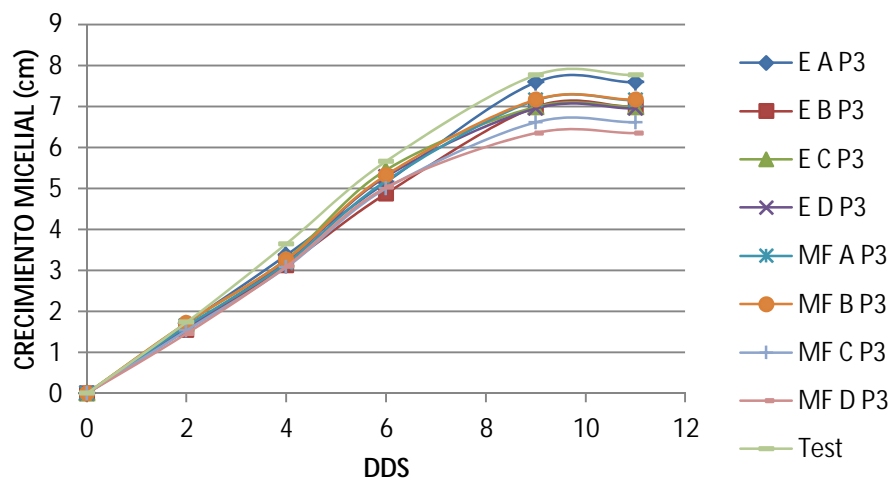


**Gráfica n° 21.** Crecimiento de *F. solani* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P1, comparado con el crecimiento de *F. solani* (testigo) crecido en PDA.

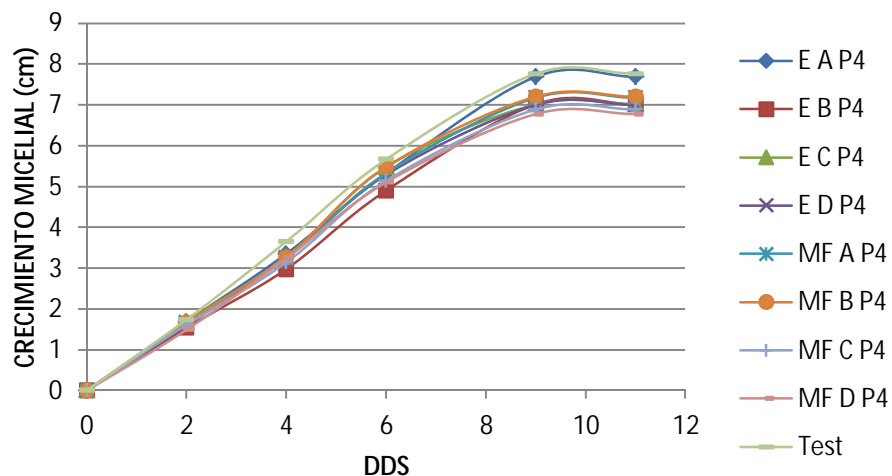




**Gráfica n° 22.** Crecimiento de *F. solani* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P2, comparado con el crecimiento de *F. solani* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 23.** Crecimiento de *F. solani* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P3, comparado con el crecimiento de *F. solani* (testigo) crecido en PDA.



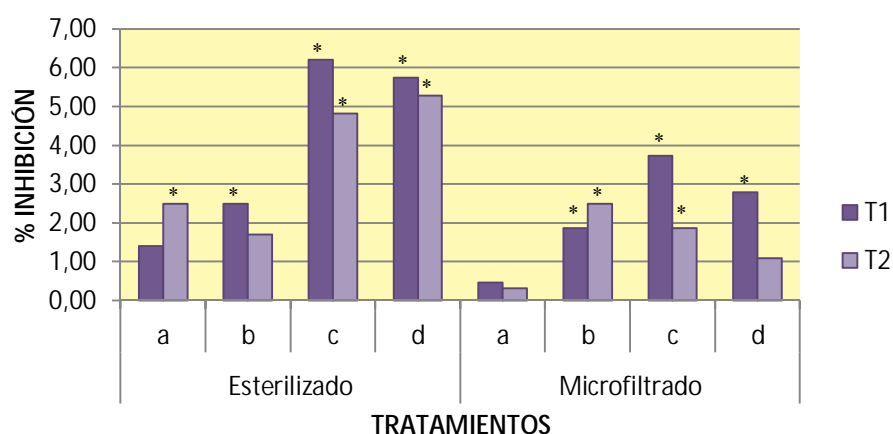
**Gráfica n° 24.** Crecimiento de *F. solani* en PDA con diferentes tratamientos del aislado P4, comparado con el crecimiento de *F. solani* (testigo) crecido en PDA.

La acción que ejercen los aislados de *Paecilomyces* sobre el crecimiento de *F. solani* es moderada, observándose una inhibición del crecimiento en las etapas finales del crecimiento micelial *in vitro*.

## 5.2.4. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a *D. bryoniae*

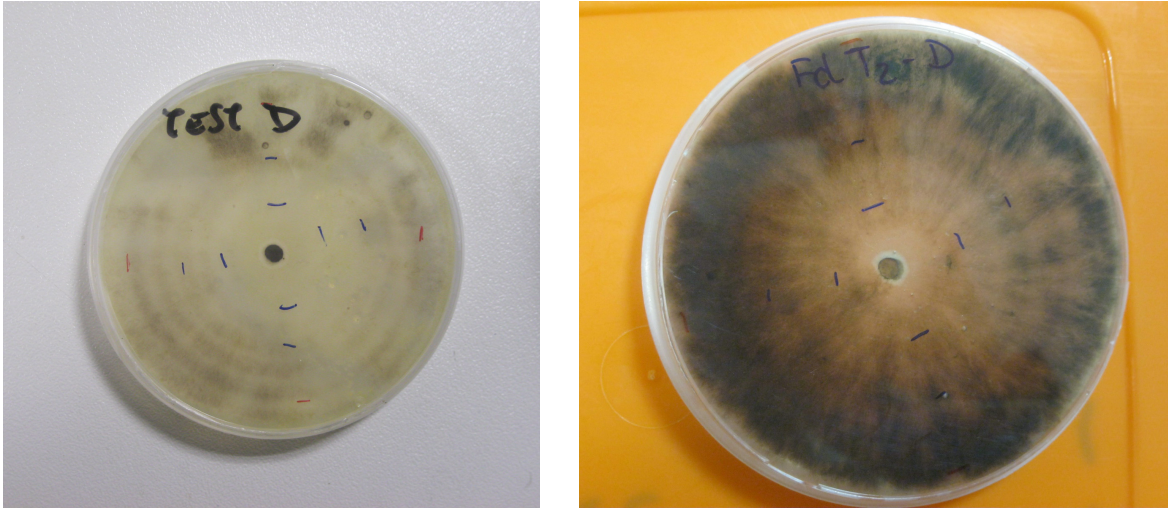
### 5.2.4.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial *in vitro*

#### 5.2.4.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de *D. bryoniae* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



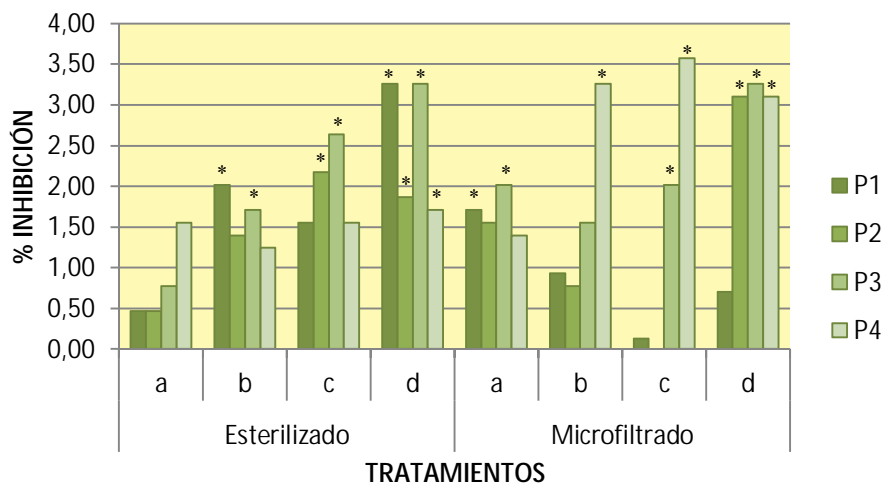
**Gráfica n° 25.** % de inhibición del crecimiento micelial de *D. bryoniae* frente a dos cepas de *T. saturnisporum*.

Tanto los tratamientos esterilizados como los microfiltrados provocan una escasa inhibición del crecimiento micelial de *D. bryoniae*, consiguiendo valores medios de inhibición del 3% (Foto n° 7) y no superando en ningún caso el 7%. La inhibición parece aumentar a medida que lo hace la concentración de extracto, sobre todo en los tratamientos esterilizados. La gran mayoría de ellos presentan diferencias significativas con respecto al testigo (LSD 95%).



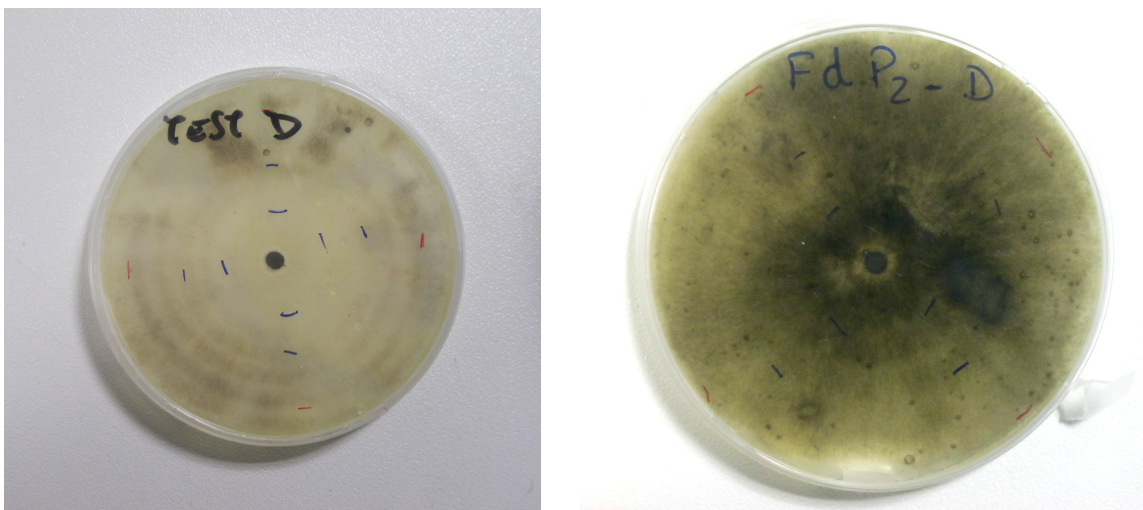
**Foto n° 7.** Crecimiento micelial de *D. bryoniae* sobre PDA con un 50% de extracto microfiltrado del aislado T2 comparado con el testigo.

#### 5.2.4.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de *D. bryoniae* frente a cuatro aislados de *P. variotii*



**Gráfica n° 26.** % de inhibición del crecimiento micelial de *D. bryoniae* frente a cuatro cepas de *P. variotii*.

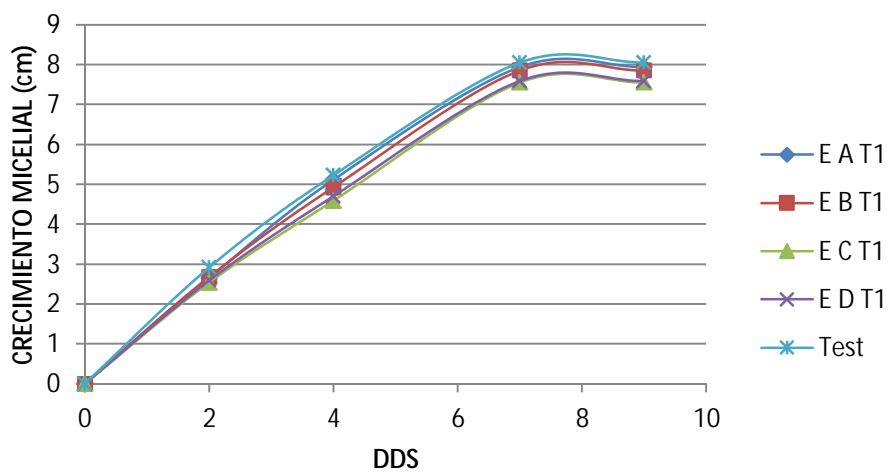
Frente a *D. bryoniae*, el efecto inhibitorio de los metabolitos producidos por los diversos aislados de *Paecilomyces* es prácticamente nulo, mostrando un % de inhibición siempre por debajo del 4% (Foto n° 8). Muchos de los tratamientos no han mostrado diferencias significativas según ANOVA SIMPLE (nivel de confianza 95%) comparado con el testigo.



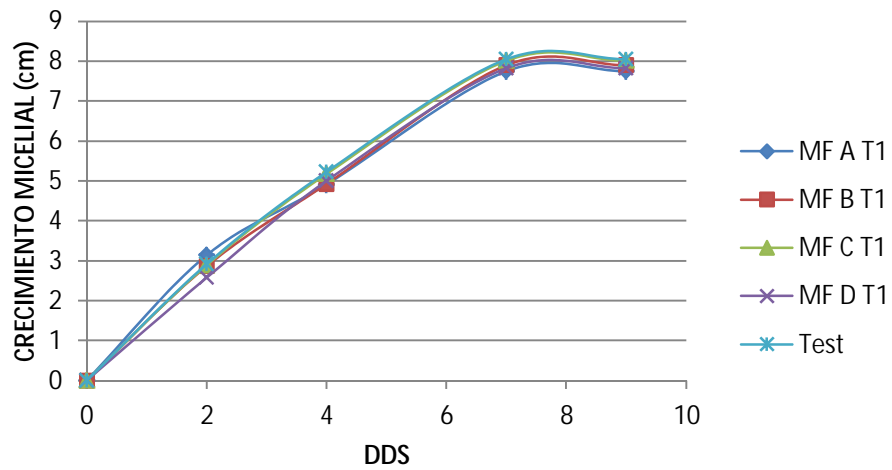
**Foto n° 8.** Crecimiento micelial de *D. bryoniae* sobre PDA con un 50% de extracto microfiltrado del aislado P2 comparado con el testigo.

#### 5.2.4.2. Evolución del crecimiento micelial

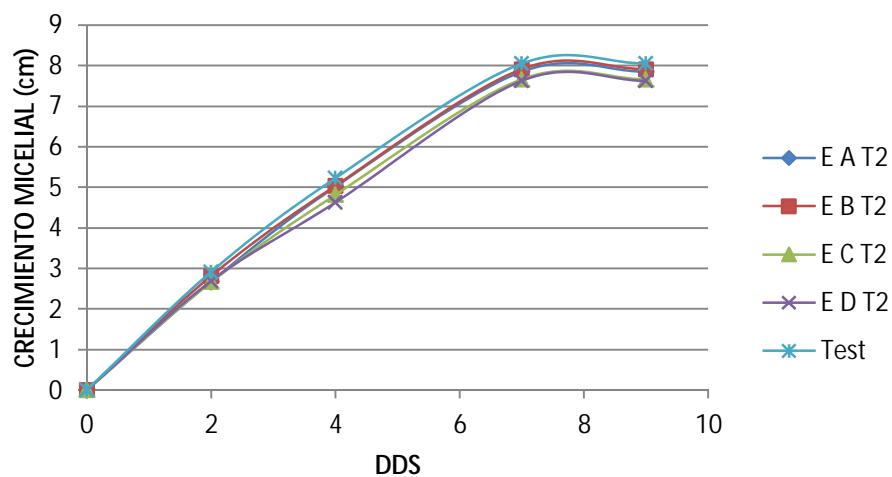
##### 5.2.4.2.1. Evolución del crecimiento micelial de *D. bryoniae* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



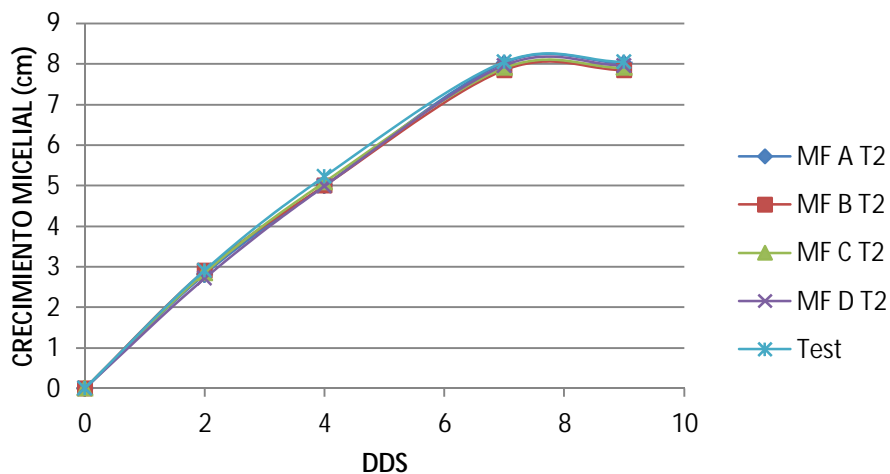
**Gráfica n° 27.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica nº 28.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.



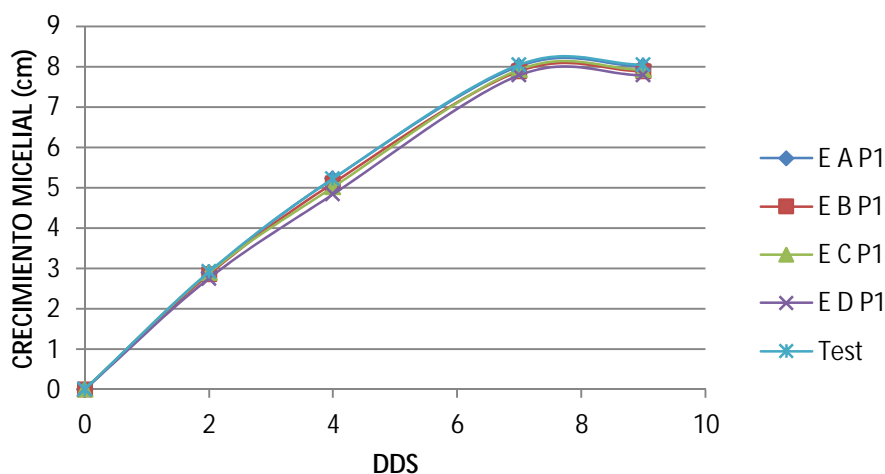
**Gráfica nº 29.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T2, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.



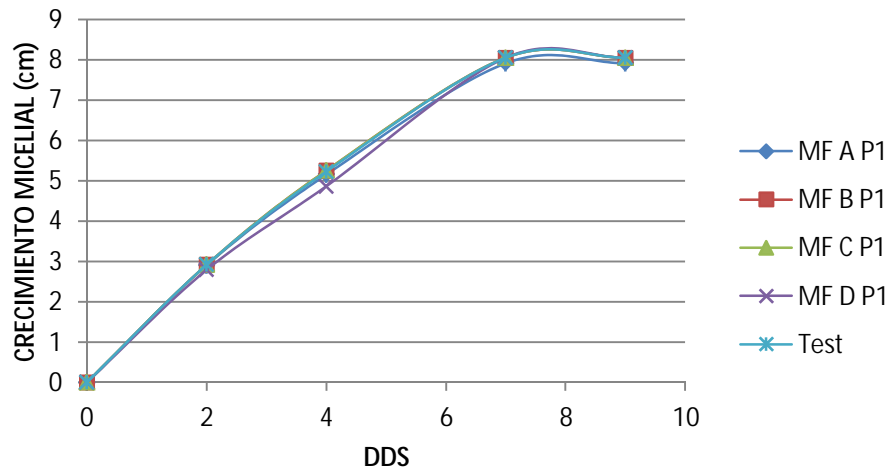
**Gráfica n° 30.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T2, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.

*D. bryoniae* no ve inhibido su crecimiento en presencia de metabolitos procedentes de ambos aislados del género *Trichoderma*.

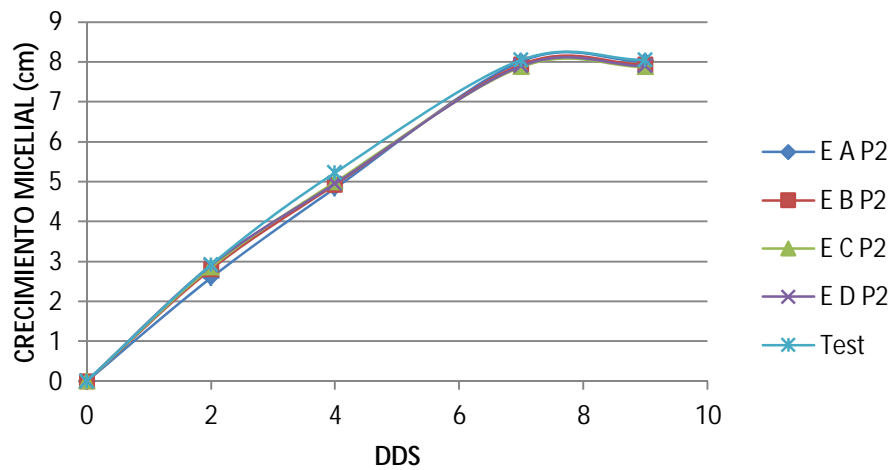
#### 5.2.4.2.2. Evolución del crecimiento micelial de *D. bryoniae* frente a cuatro aislados de *P. variotii*



**Gráfica n° 31.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P1, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.

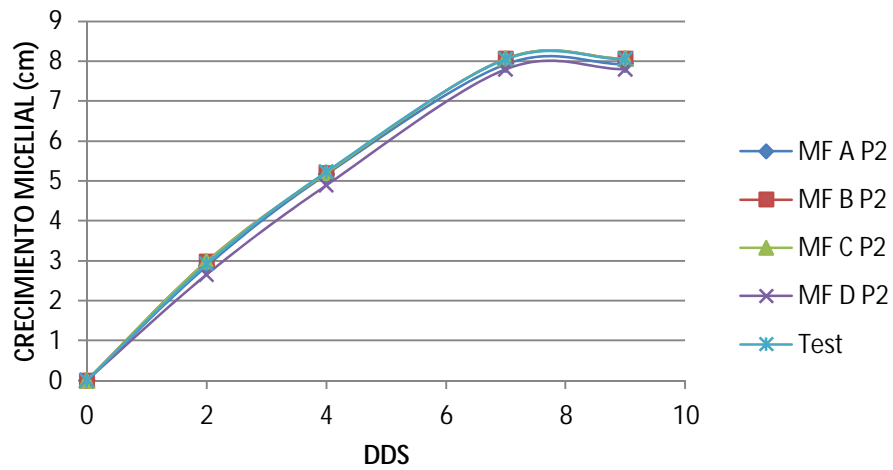


**Gráfica n° 32.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P1, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.

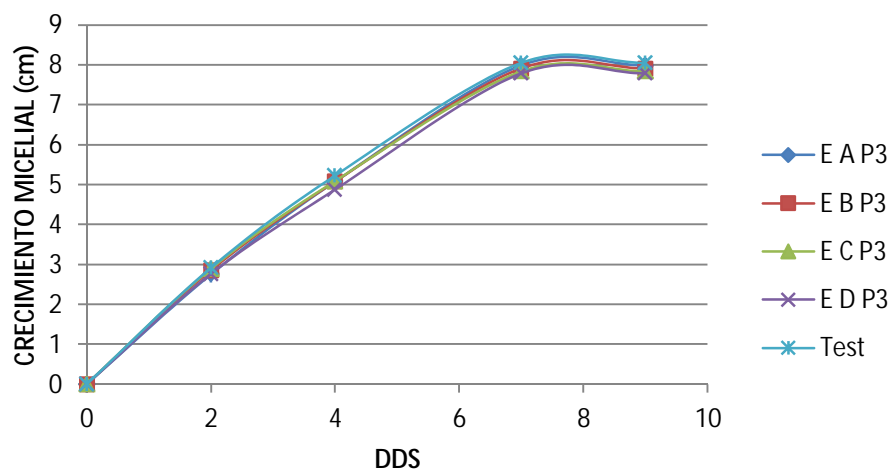


**Gráfica n° 33.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P2, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.

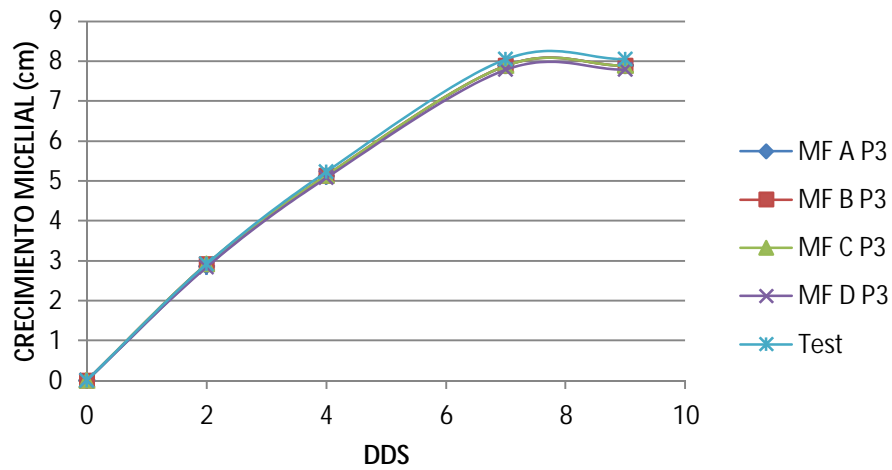




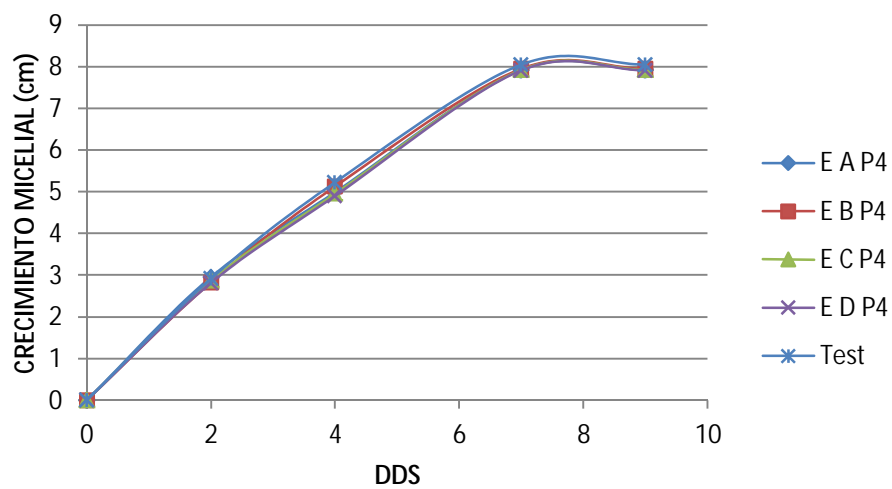
**Gráfica nº 34.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P2, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.



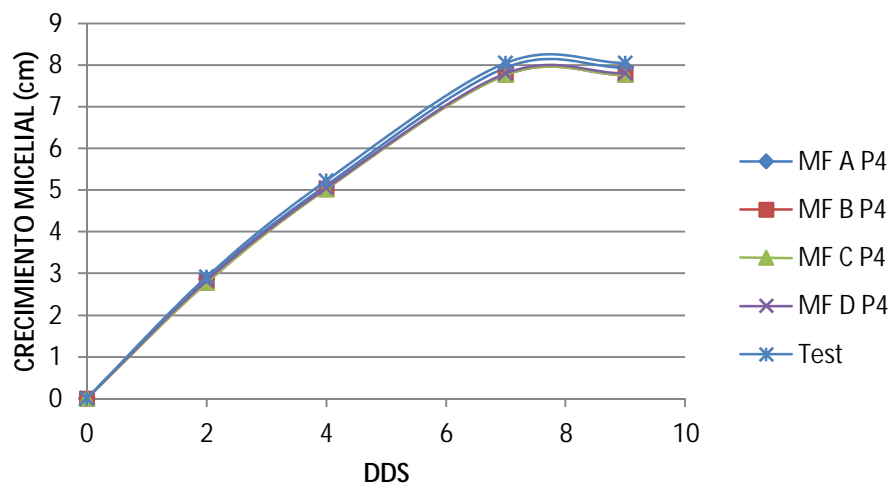
**Gráfica nº 35.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P3, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 36.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P3, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 37.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P4, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.



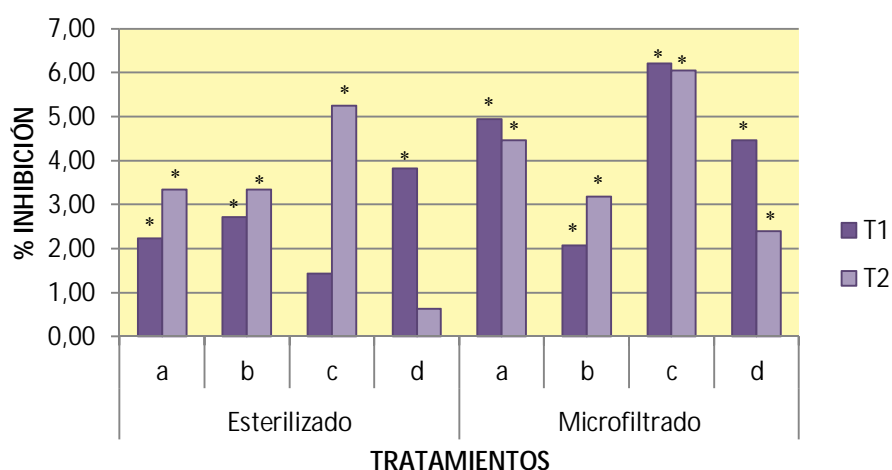
**Gráfica n° 38.** Crecimiento de *D. bryoniae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P4, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo) crecido en PDA.

La presencia en el medio de cultivo de sustancias metabólicas de los diversos aislados de *Paecilomyces* no influye en el crecimiento *in vitro* de *D. bryoniae*.

## 5.2.5. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a *P. parasitica*

### 5.2.5.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial *in vitro*

#### 5.2.5.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de *P. parasitica* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



**Gráfica nº 39.** % de inhibición del crecimiento micelial de *P. parasitica* frente a dos cepas de *T. saturnisporum*.

*P. parasitica* ve levemente alterado su crecimiento por la presencia de metabolitos de los dos aislados de *T. saturnisporum*. El mayor % de inhibición se sitúa en torno a 5-6% (Foto nº 9) para altas concentraciones de extracto. La mayoría de los tratamientos realizados en este ensayo presentan diferencias significativas con respecto al testigo, según ANOVA SIMPLE.

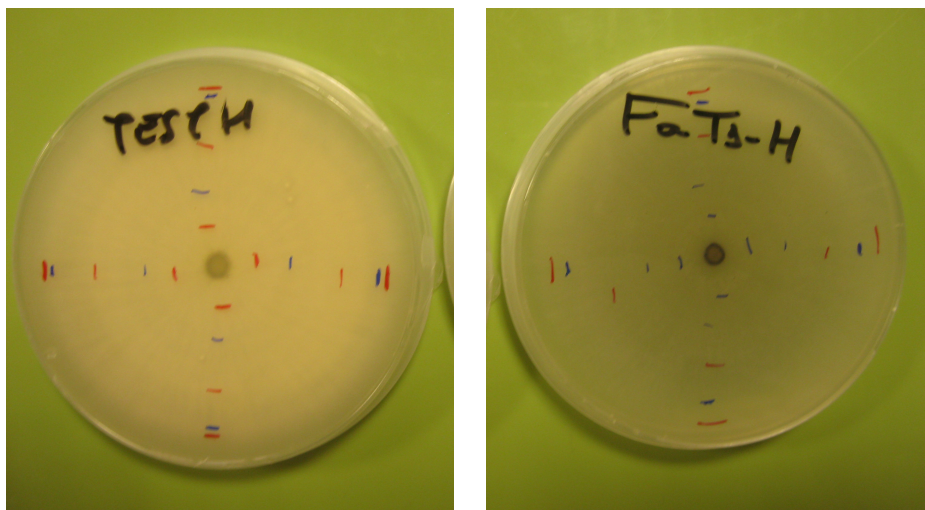
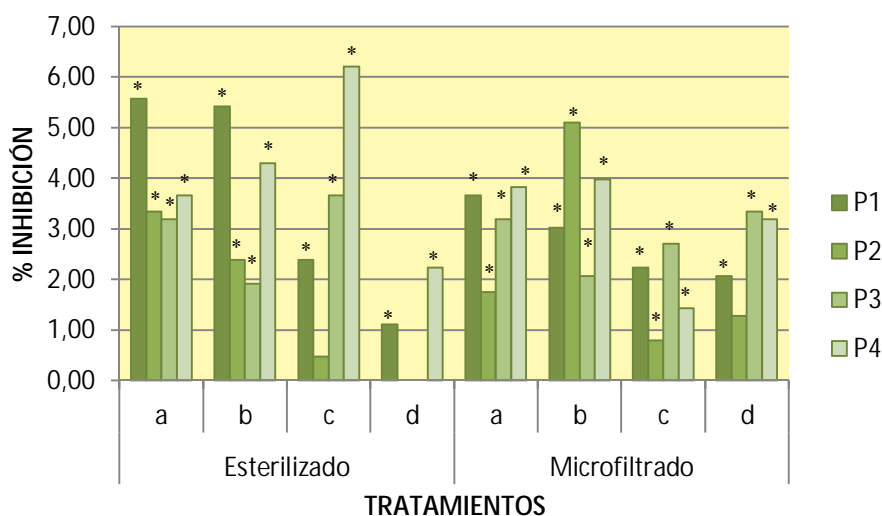


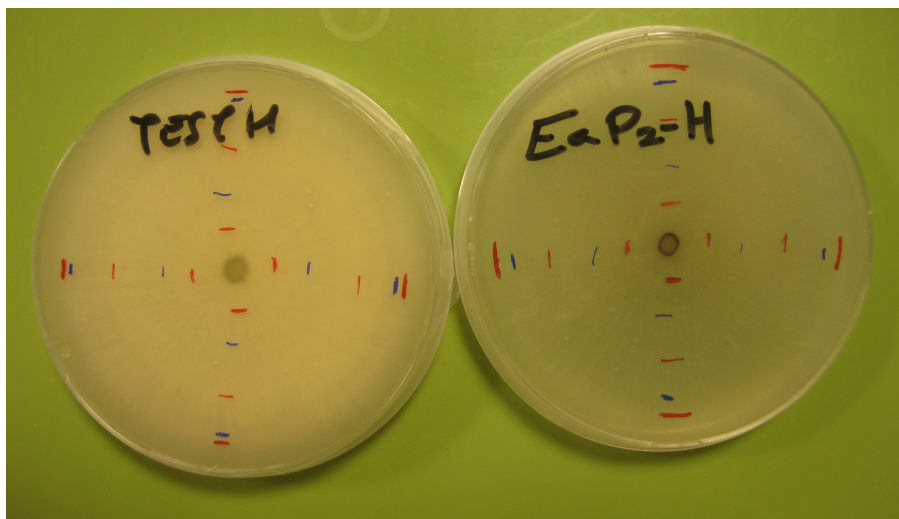
Foto n° 9. Crecimiento micelial de *P. parasitica* sobre PDA con un 5% de extracto microfiltrado del aislado T1 comparado con el testigo.

#### 5.2.5.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de *P. parasitica* frente a cuatro aislados de *P. variotii*



Gráfica n° 40. % de inhibición del crecimiento micelial de *P. parasitica* frente a cuatro cepas de *P. variotii*.

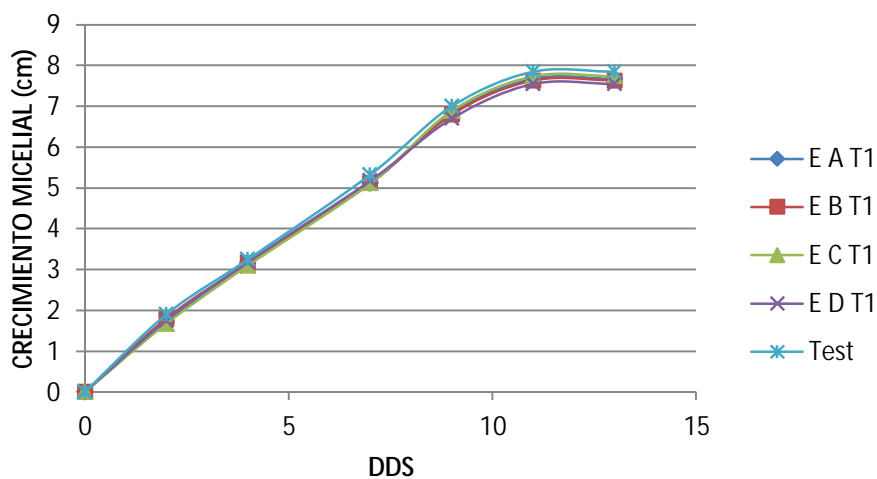
Los % de inhibición frente a *P. parasitica* de los diferentes tratamientos son muy bajos y variables, rondando en la mayoría de tratamientos el 3-4% (Foto n° 10) y siempre observándose valores por debajo del 7% de inhibición. La concentración de extracto utilizada parece no tener importancia, incluso parece que la inhibición es ligeramente menor según aumenta la concentración. Tan sólo algunos tratamientos no presentan diferencias significativas (LSD 95%).



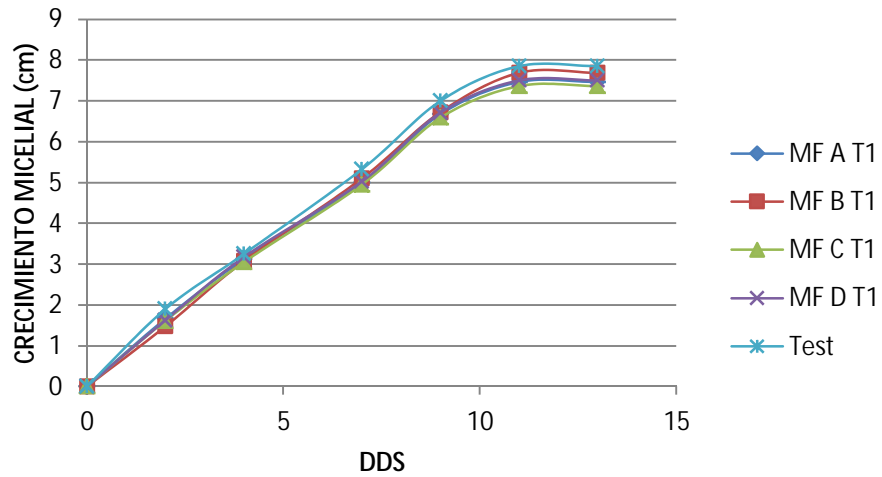
**Foto n° 10.** Crecimiento micelial de *P. parasitica* sobre PDA con un 5% de extracto esterilizado del aislado P2 comparado con el testigo.

#### 5.2.5.2. Evolución del crecimiento micelial

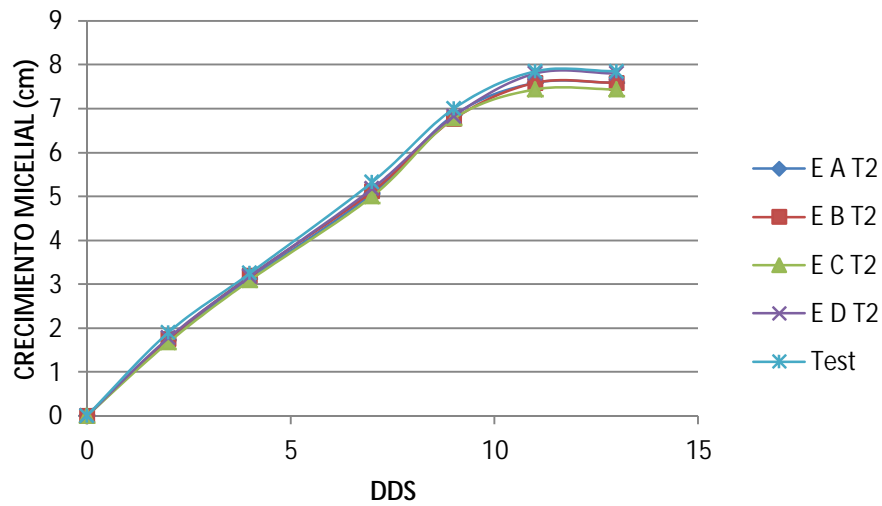
##### 5.2.5.2.1. Evolución del crecimiento micelial de *P. parasitica* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



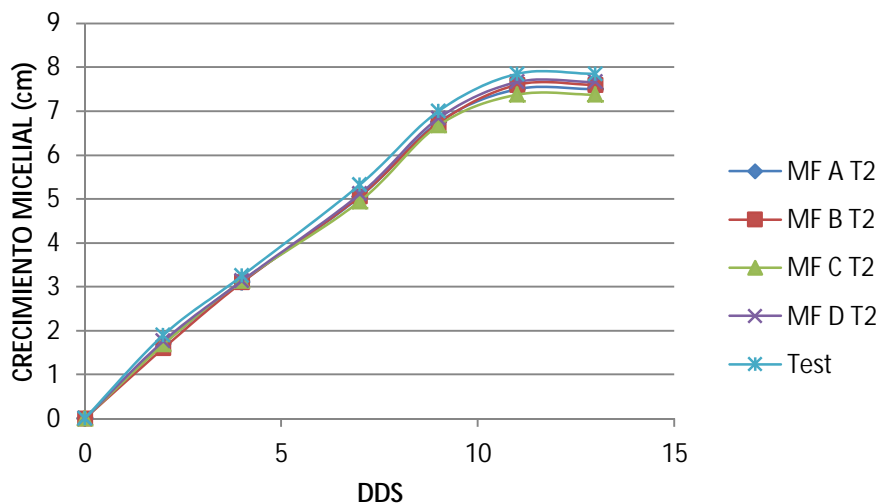
**Gráfica n° 41.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 42.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.



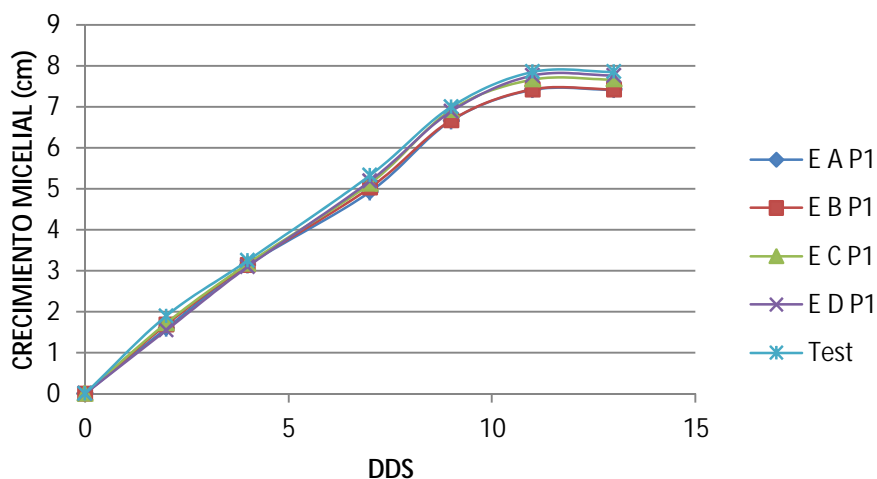
**Gráfica n° 43.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T2, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 44.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T2, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.

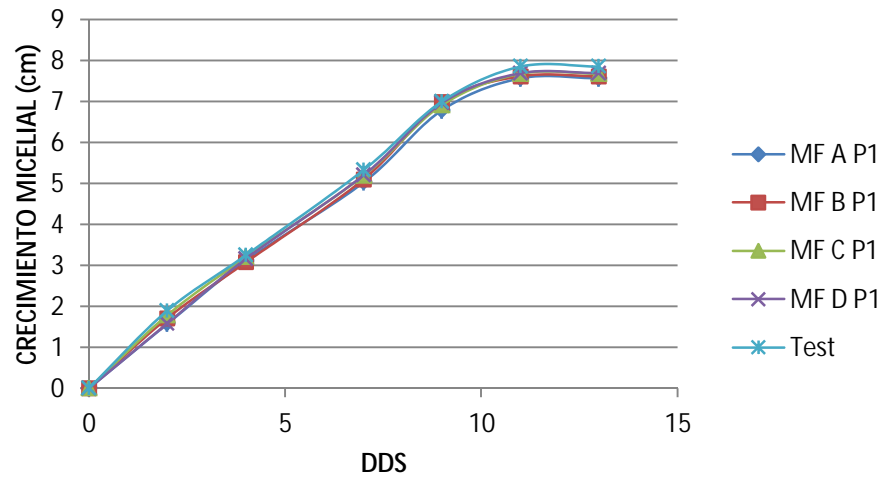
El desarrollo del crecimiento de *P. parasitica* apenas se ve alterado por la presencia en el medio de cultivo de metabolitos secundarios producidos por T1 y T2.

#### 5.2.5.2.2. Evolución del crecimiento micelial de *P. parasitica* frente a cuatro aislados de *P. variotii*

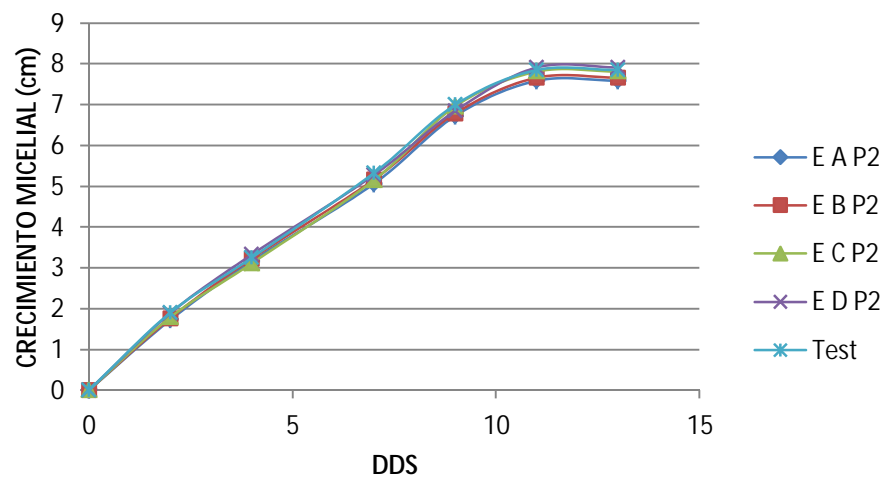


**Gráfica n° 45.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P1, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.

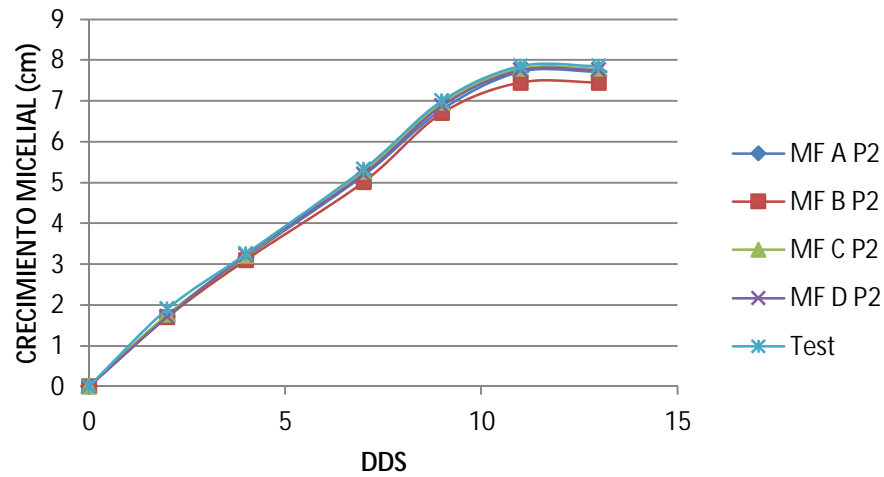




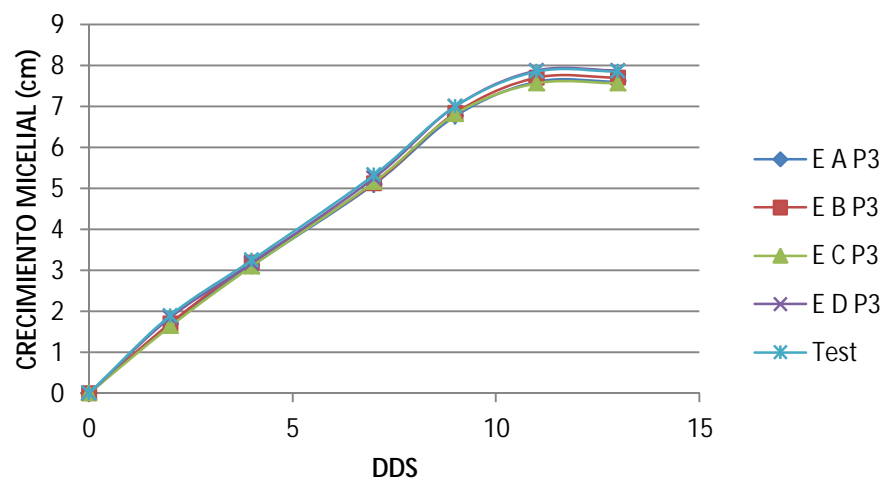
**Gráfica n° 46.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P1, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.



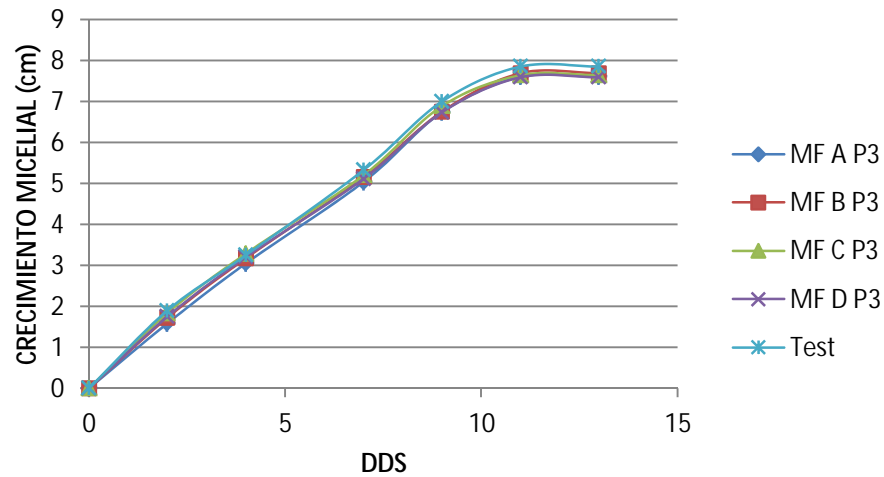
**Gráfica n° 47.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P2, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.



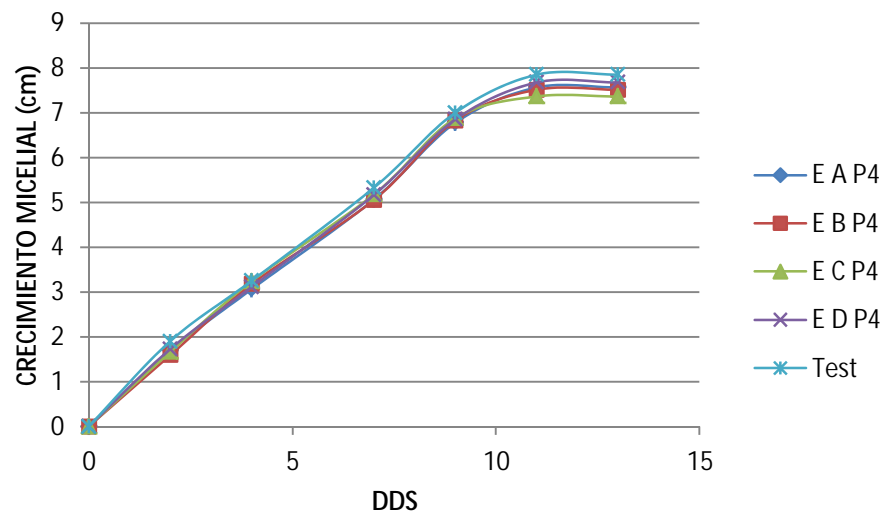
**Gráfica n° 48.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P2, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.



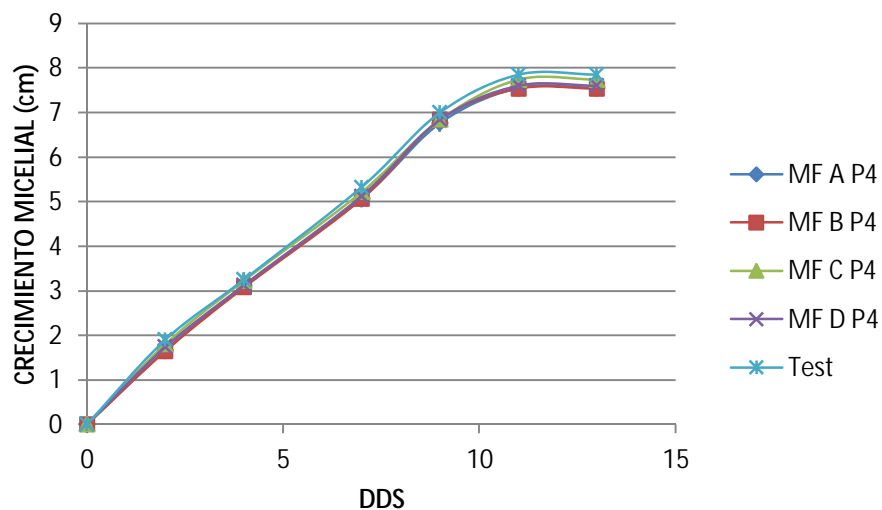
**Gráfica n° 49.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P3, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica nº 50.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P3, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica nº 51.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P4, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.



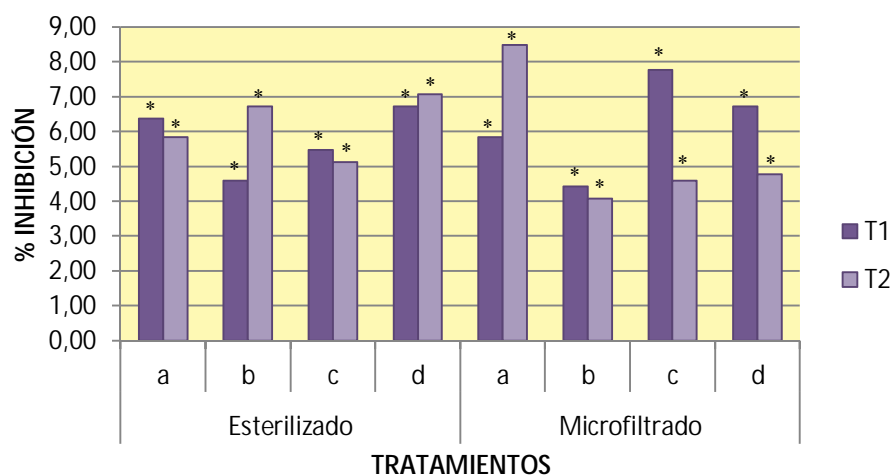
**Gráfica n° 52.** Crecimiento de *P. parasitica* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P4, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo) crecido en PDA.

Ninguno de los aislados de *Paecilomyces* produce metabolitos secundarios no volátiles con capacidad antagonista sobre *P. parasitica*.

## 5.2.6. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos producidos por los aislados frente a *V. dahliae*

### 5.2.6.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial *in vitro*

#### 5.2.6.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



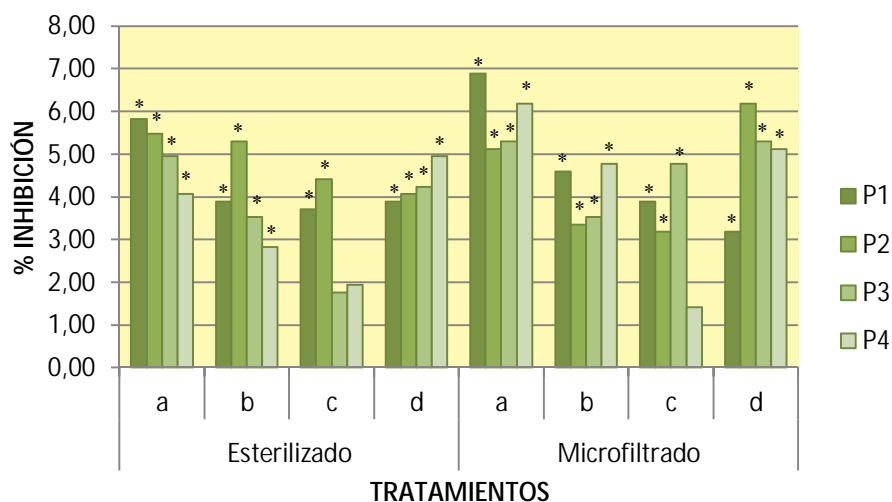
**Gráfica n° 53.** % de inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* frente a dos cepas de *T. saturnisporum*.

Los metabolitos de los aislados T1 y T2 presentan un escaso efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *V. dahliae*, presentando valores medios que rondan el 5-6% (Foto n° 11), aunque algunos de los tratamientos alcanzan valores cercanos al 8-9%. Los % de inhibición se muestran constantes independientemente de la concentración de extracto utilizada y del tratamiento realizado a éste. Todos ellos presentan diferencias significativas con respecto al testigo (LSD 95%).



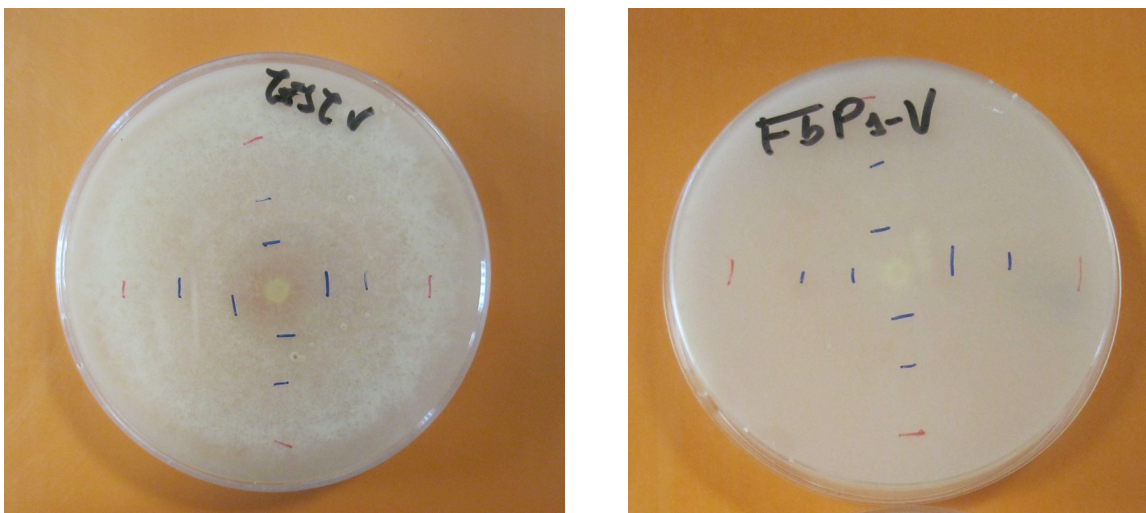
**Foto n° 11.** Crecimiento micelial de *V. dahliae* sobre PDA con un 5% de extracto esterilizado del aislado T1 comparado con el testigo.

#### 5.2.6.1.2. Inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* frente a cuatro aislados de *P. variotii*



**Gráfica n° 54.** % de inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* frente a cuatro cepas de *P. variotii*.

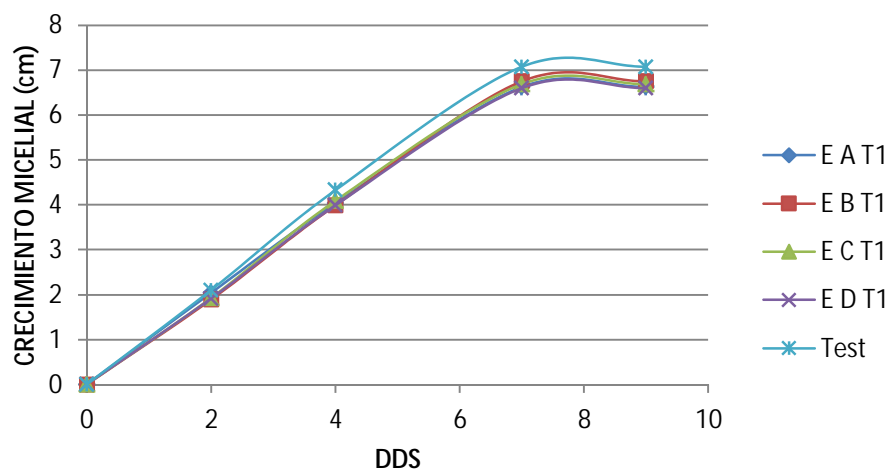
La inhibición provocada por los extractos de *Paecilomyces* sobre el crecimiento de *V. dahliae* ha sido reducida, observándose % de inhibición alrededor del 4-5% (Foto n° 12) para la mayoría de tratamientos, aunque algunos llegan a alcanzar casi el 7% de inhibición. Los aislados P1 y P2 muestran unas inhibiciones ligeramente superiores. La gran mayoría de tratamientos realizados muestra diferencias significativas, según ANOVA SIMPLE.



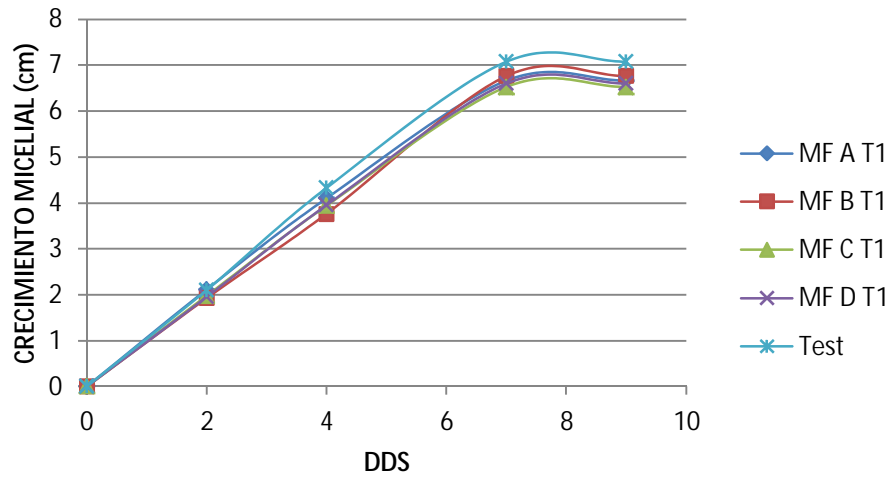
**Foto n° 12.** Crecimiento micelial de *V. dahliae* sobre PDA con un 10% de extracto microfiltrado del aislado P1 comparado con el testigo.

### 5.2.6.2. Evolución del crecimiento micelial

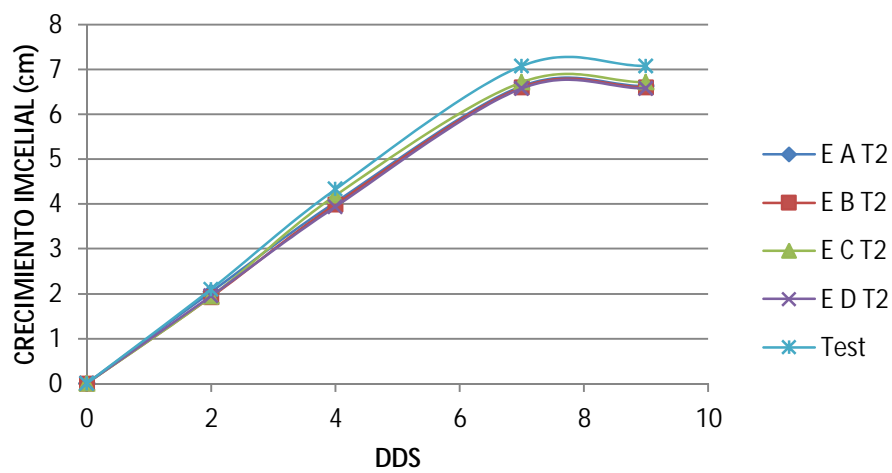
#### 5.2.6.2.1. Evolución del crecimiento micelial de *V. dahliae* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



**Gráfica n° 55.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.

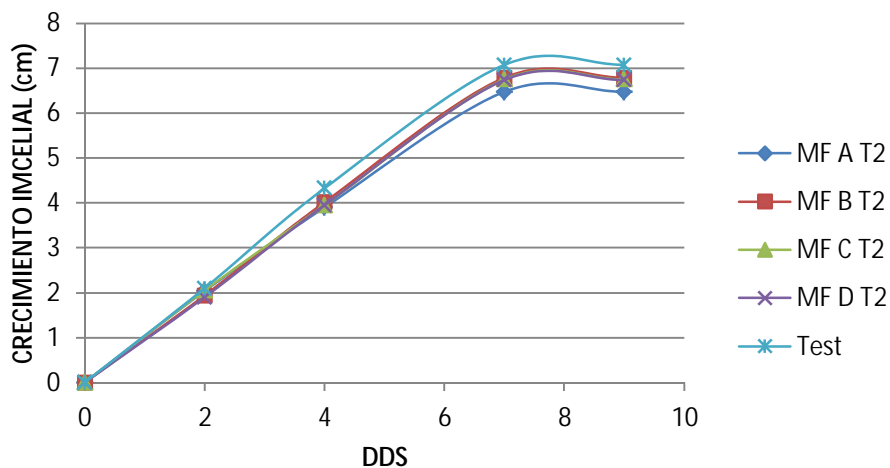


**Gráfica n° 56.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 57.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T2, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.

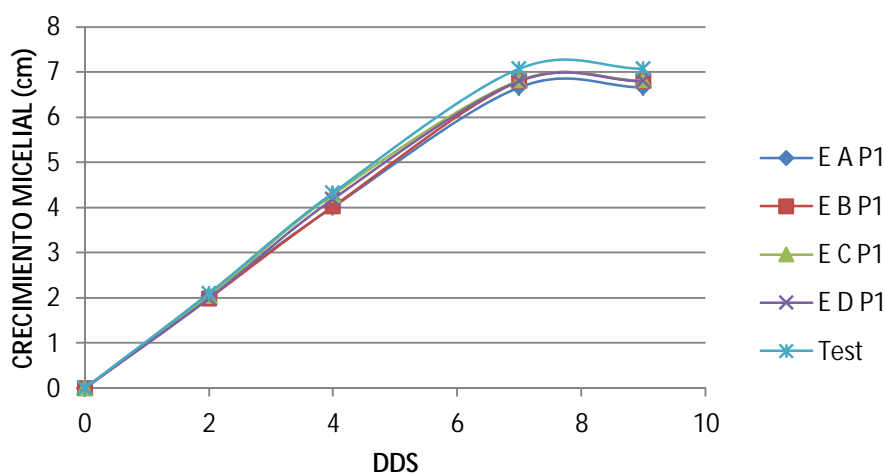




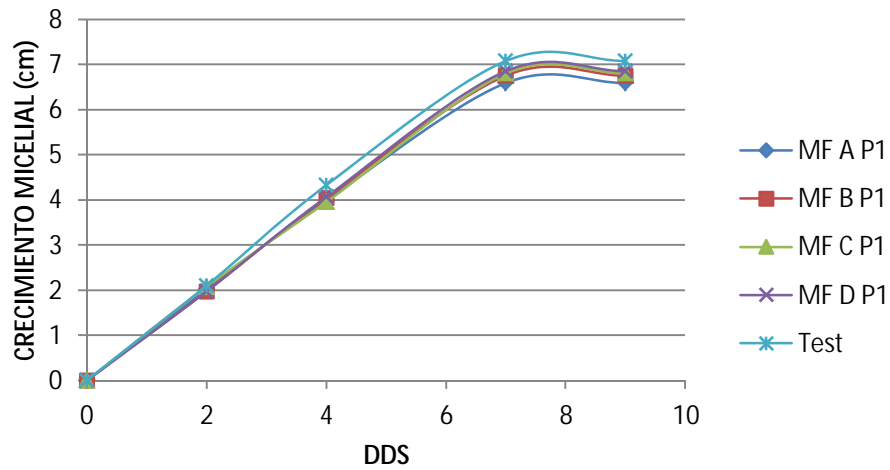
**Gráfica n° 58.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T2, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.

Existe una baja influencia de los extractos solubles de T1 y T2 frente al crecimiento y desarrollo de *V. dahliae*, observándose una leve inhibición.

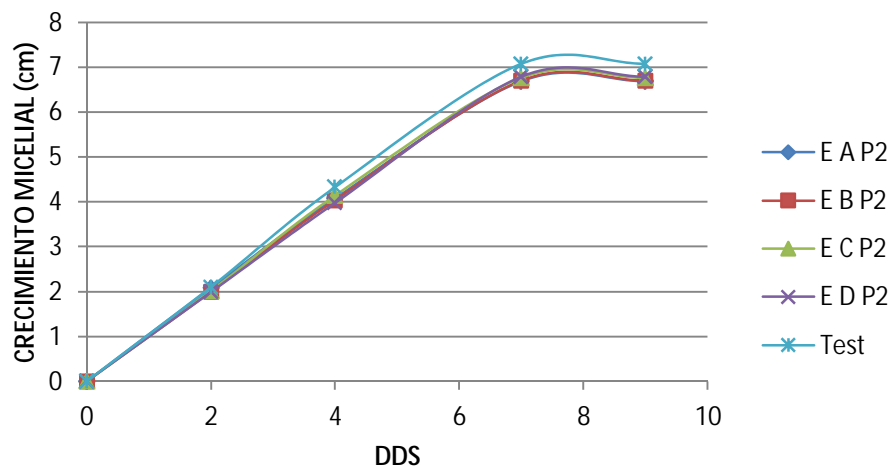
#### 5.2.6.2.2. Evolución del crecimiento micelial de *V. dahliae* frente a cuatro aislados de *P. variotii*



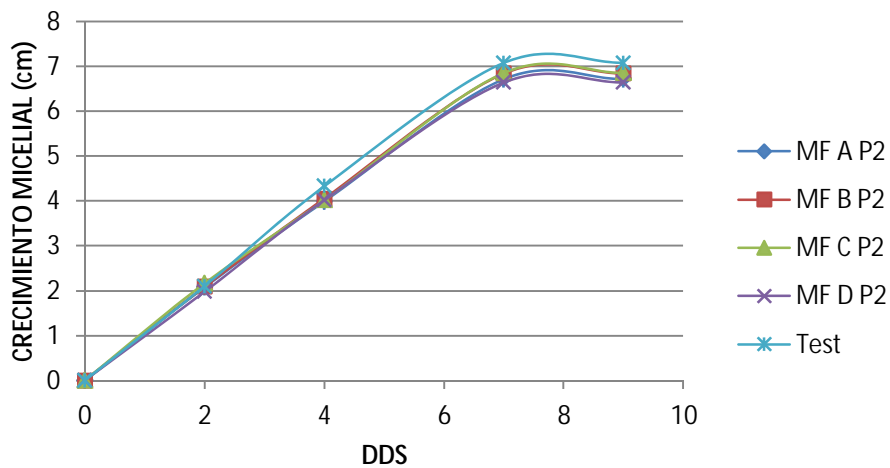
**Gráfica n° 59.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P1, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.



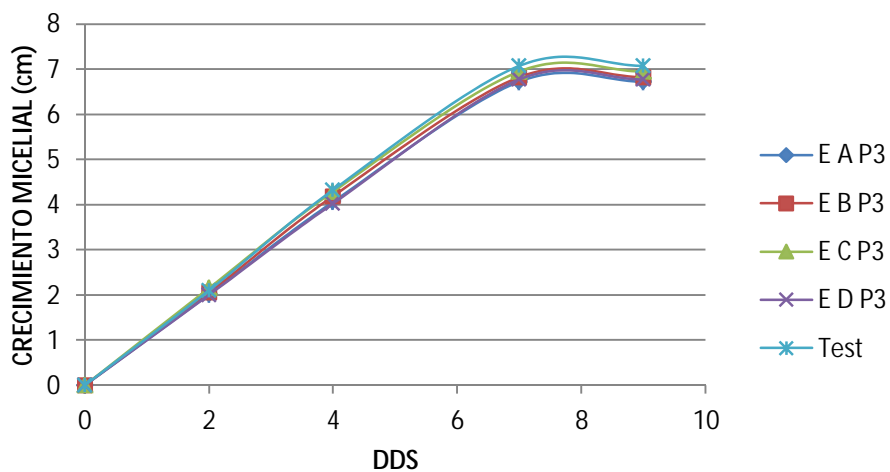
**Gráfica n° 60.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P1, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.



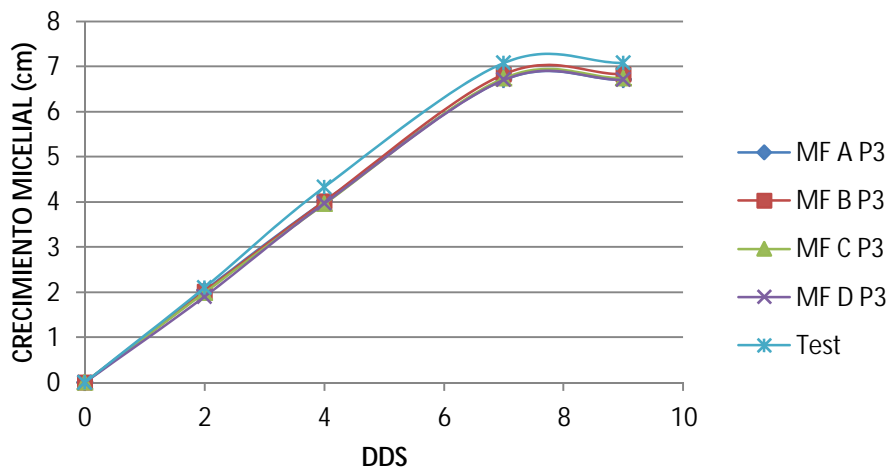
**Gráfica n° 61.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.



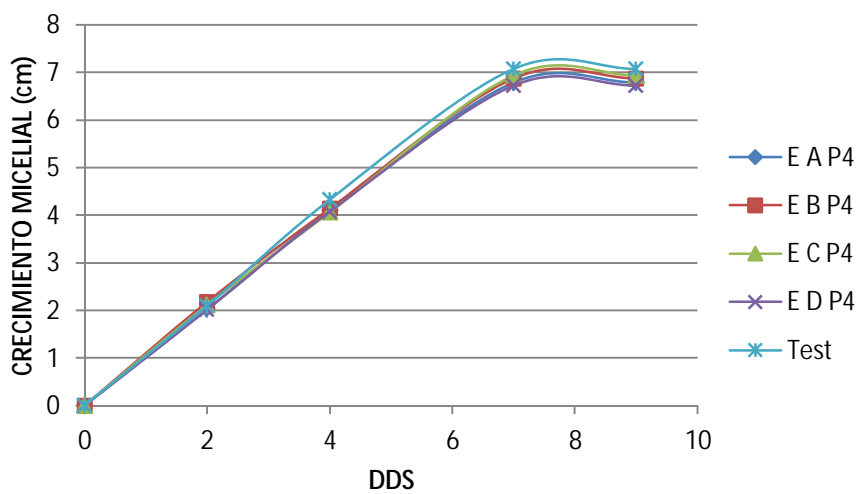
**Gráfica nº 62.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.



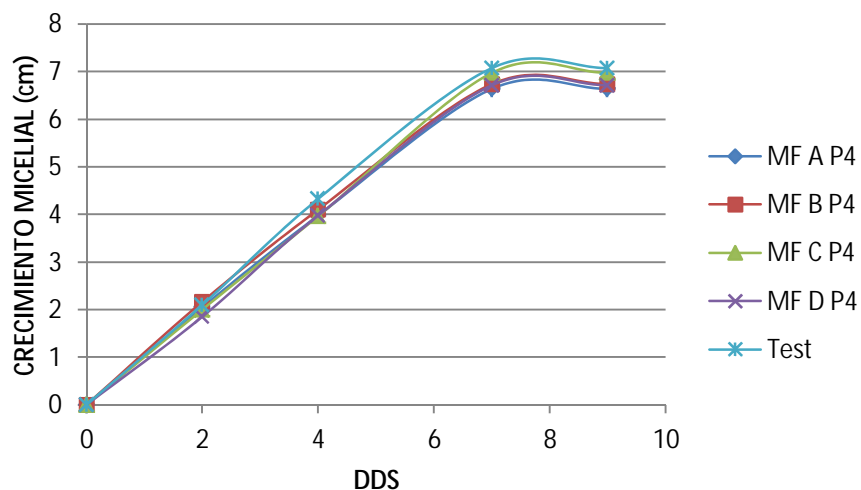
**Gráfica nº 63.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P3, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 64.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P3, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 65.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P4, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.



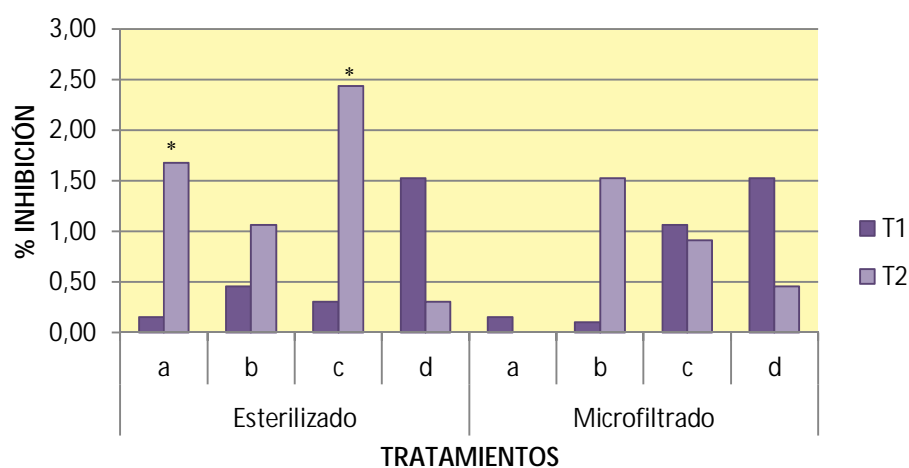
**Gráfica n° 66.** Crecimiento de *V. dahliae* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P4, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en PDA.

Los metabolitos no volátiles procedentes de los aislados seleccionados de *Paecilomyces* tienen una baja capacidad antagonista frente a *V. dahliae*, observándose apenas una leve reducción del crecimiento micelial *in vitro*.

## 5.2.7. Evaluación del efecto antagonista de los producidos por los aislados frente a *B. cinerea*

### 5.2.7.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial *in vitro*

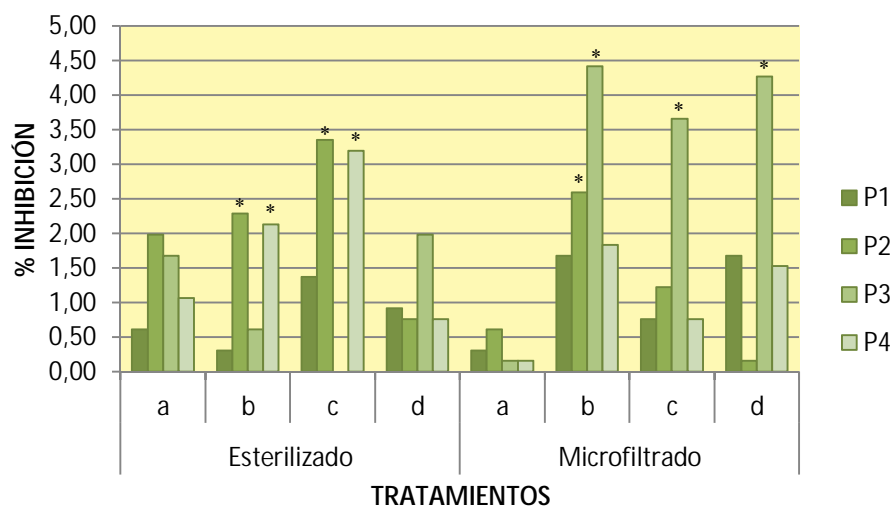
#### 5.2.7.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



**Gráfica n° 67.** % de inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* frente a dos cepas de *T. saturnisporum*.

Ninguno de los aislados seleccionados produce metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de *B. cinerea*. Los % de inhibición medidos no superan en ningún caso el 3%, incluso a altas concentraciones de extracto, y tan sólo dos tratamientos muestran diferencias significativas con respecto al testigo, según ANOVA SIMPLE.

### 5.2.7.1.2. Evaluación del crecimiento micelial de *B. cinerea* frente a cuatro aislados de *P. variotii*

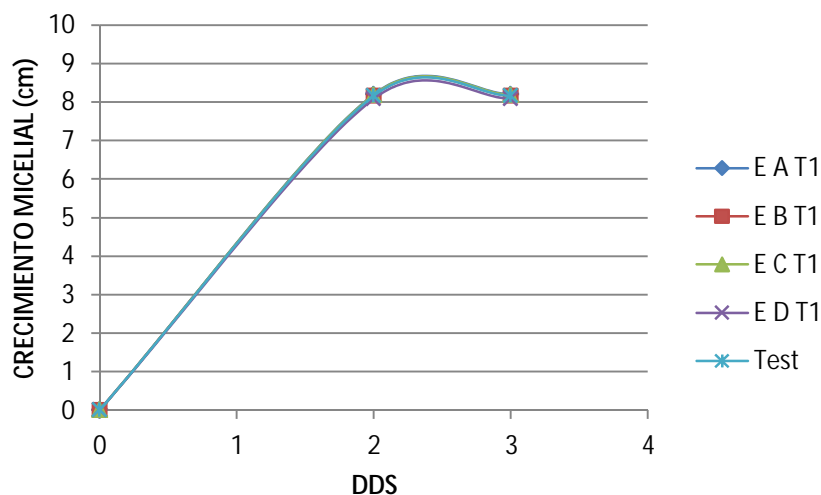


**Gráfica n° 68.** % de inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* frente a cuatro cepas de *P. variotii*.

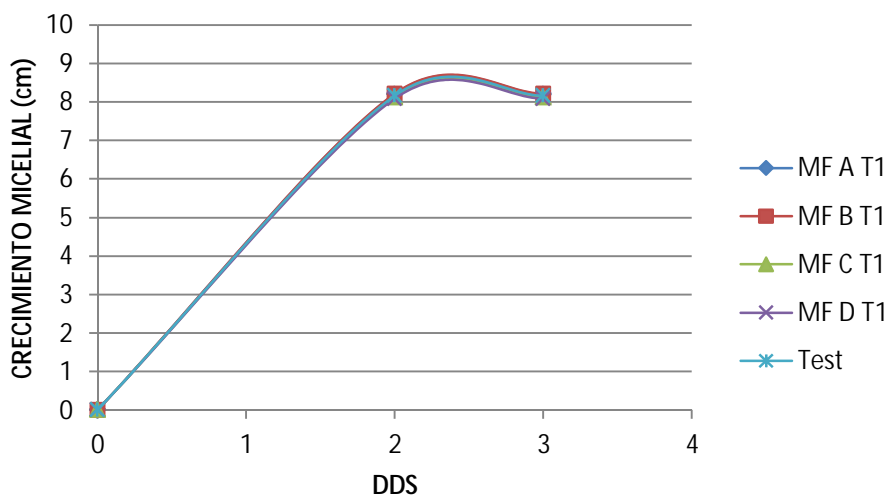
La inhibición producida por los metabolitos de los aislados de *Paecilomyces* sobre *B. cinerea* es prácticamente inexistente, ya que los % de inhibición no superan el 5%. El aislado P3 muestra inhibiciones levemente superiores al resto en los tratamientos microfiltrados. Sólo algunos tratamientos a altas concentraciones muestran diferencias significativas (nivel de confianza 95%).

### 5.2.7.2. Evolución del crecimiento micelial

#### 5.2.7.2.1. Evolución del crecimiento micelial de *B. cinerea* frente a dos aislados de *T. saturnisporum*

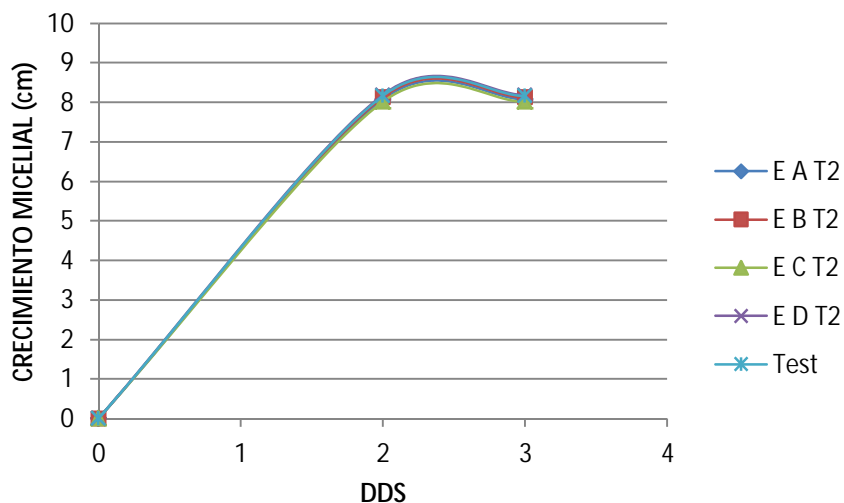


**Gráfica n° 69.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.

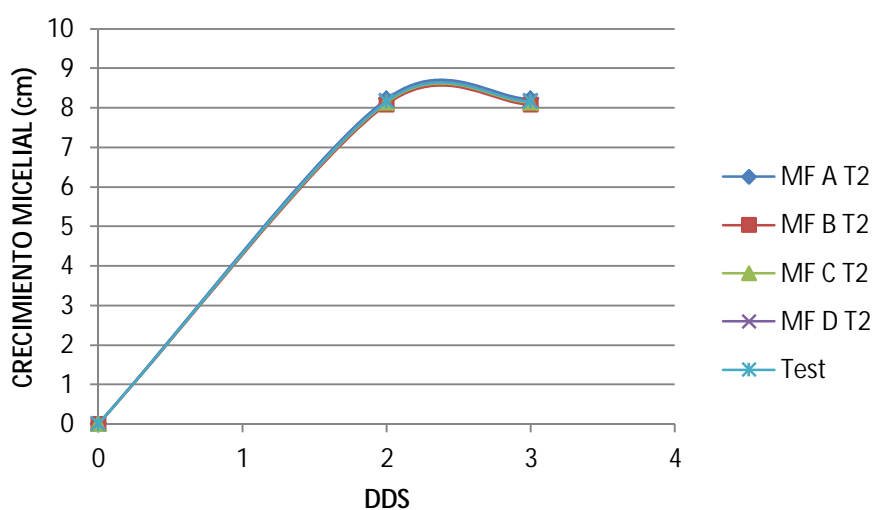


**Gráfica n° 70.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.





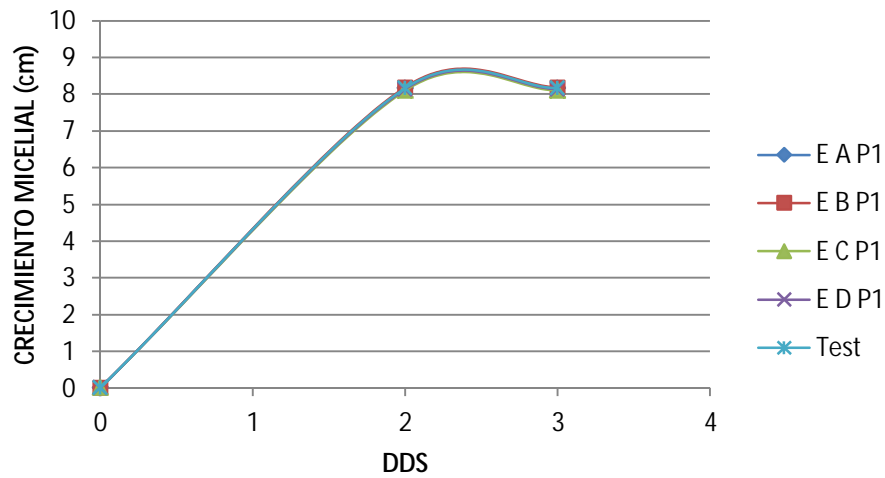
**Gráfica n° 71.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T2, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.



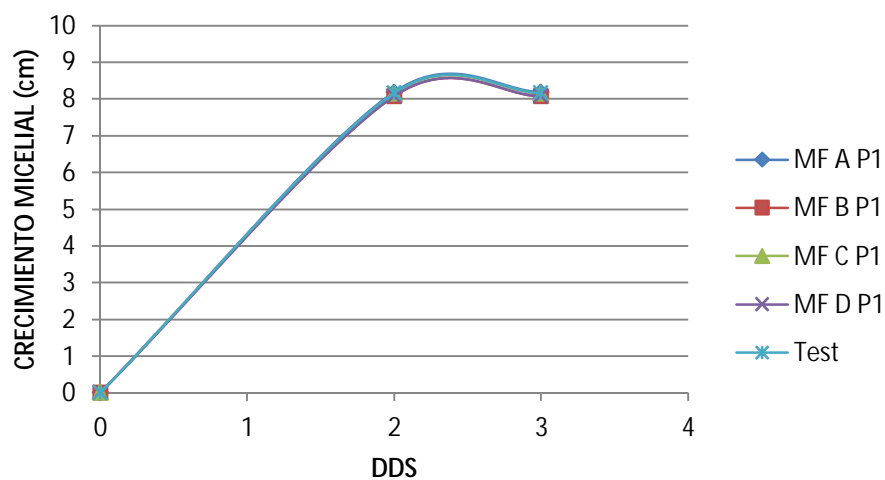
**Gráfica n° 72.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T2, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.

No se ha observado ningún efecto inhibitorio de ambos aislados de *Trichoderma* sobre *B. cinerea*.

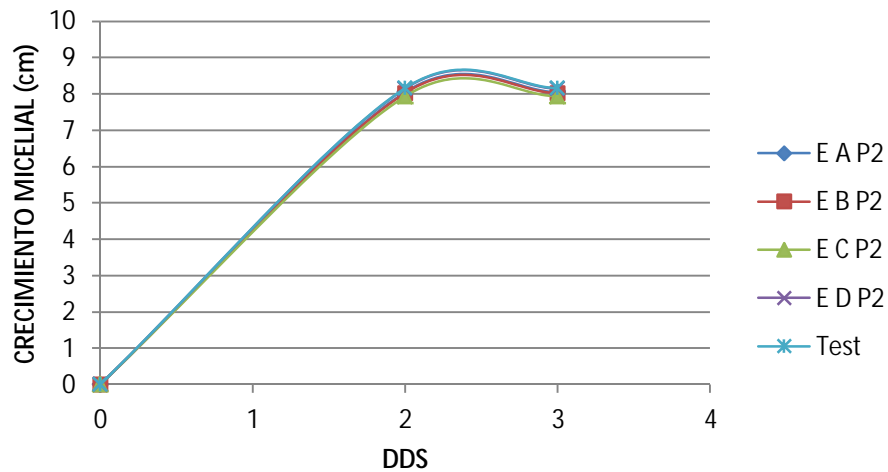
### 5.2.7.2.2. Evolución del crecimiento micelial de *B. cinerea* frente a cuatro aislados de *P. variotii*



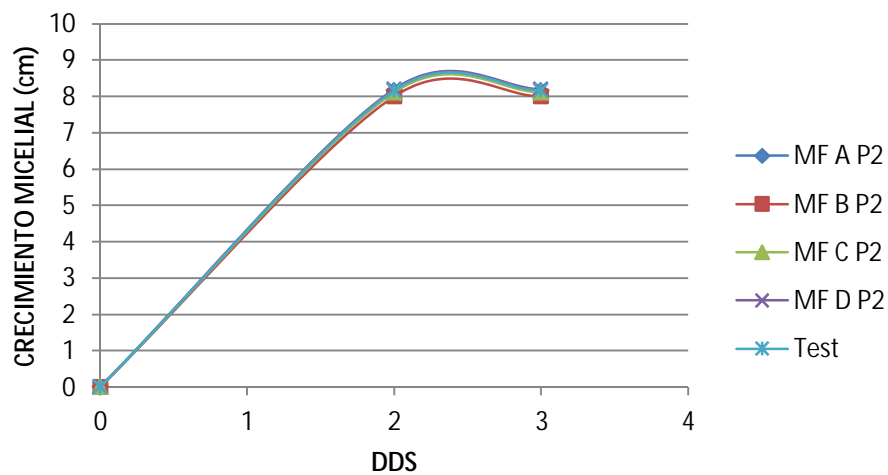
**Gráfica nº 73.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P1, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.



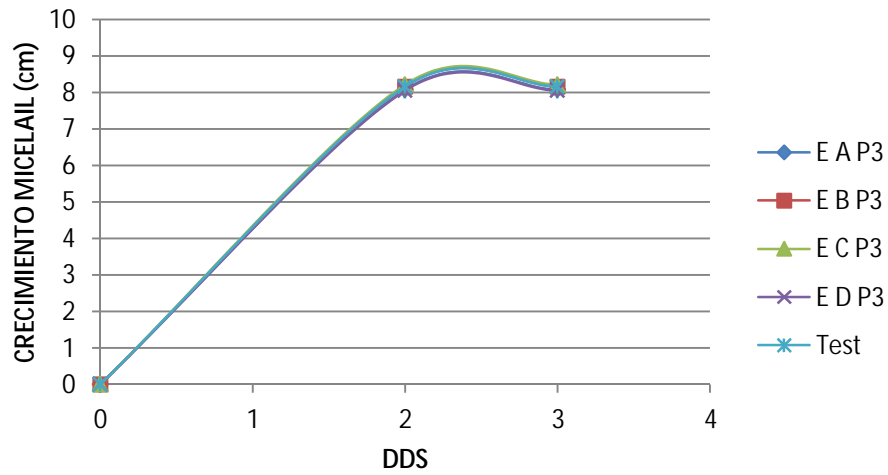
**Gráfica nº 74.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P1, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.



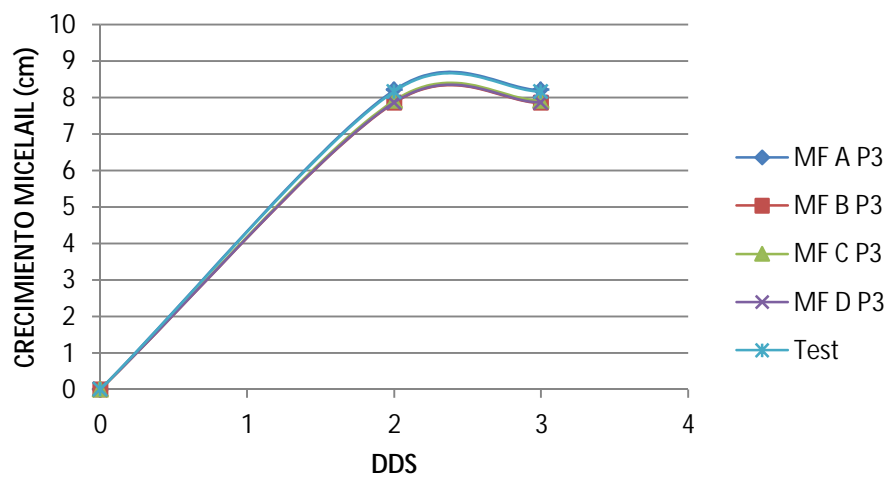
**Gráfica n° 75.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P2, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.



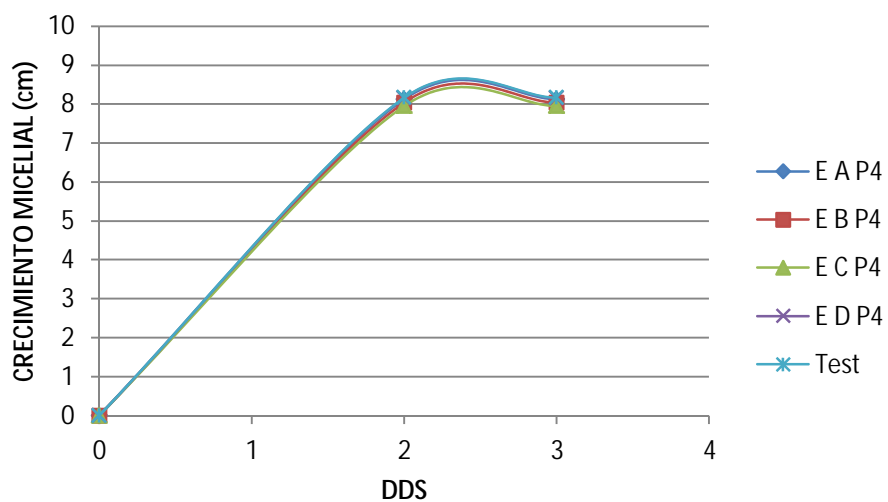
**Gráfica n° 76.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P2, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.



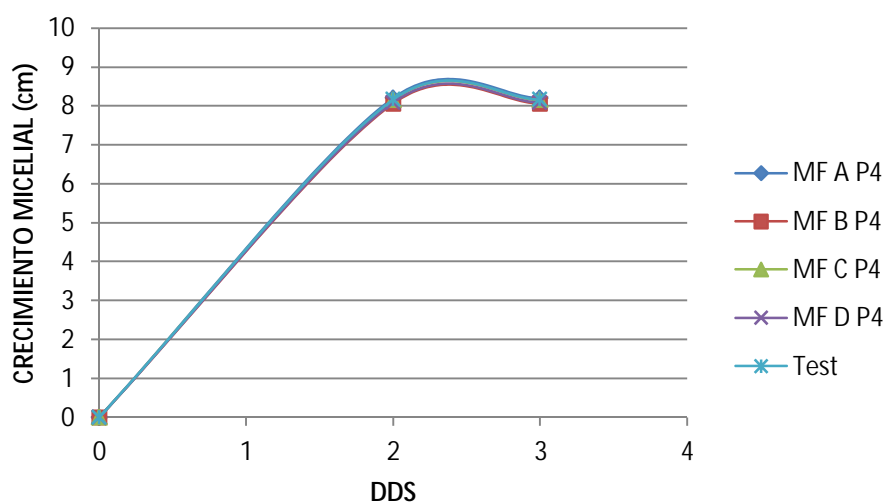
**Gráfica n° 77.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P3, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 78.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P3, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 79.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P4, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.



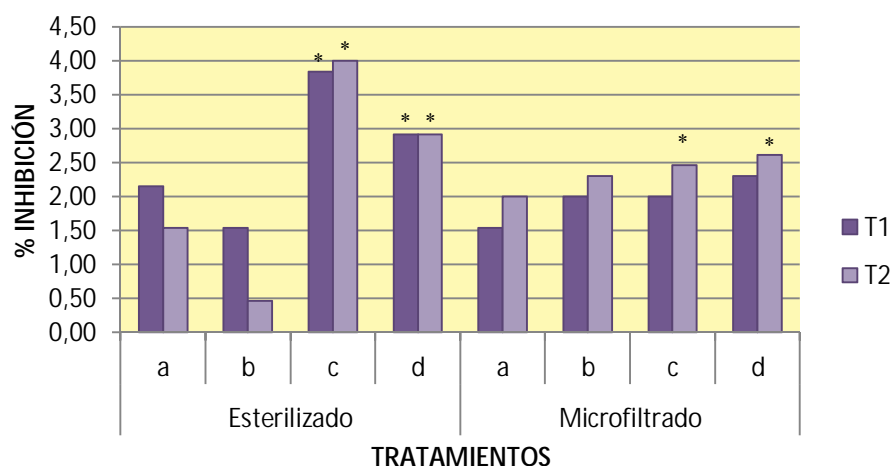
**Gráfica n° 80.** Crecimiento de *B. cinerea* en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P4, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo) crecido en PDA.

Los metabolitos secundarios de los aislados de *P. variotii* no provocan ningún tipo de inhibición micelial frente a *B. cinerea*.

## 5.2.8. Evaluación del efecto antagonista de los producidos por los aislados frente a *Pythium* sp.

### 5.2.8.1. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial *in vitro*

#### 5.2.8.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de *Pythium* sp. frente a dos aislados de *T. saturnisporum*



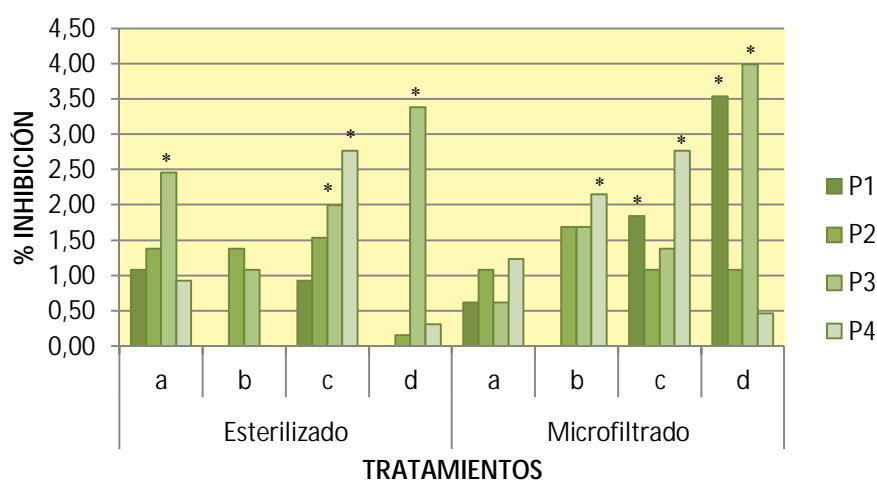
**Gráfica n° 81.** % de inhibición del crecimiento micelial de *Pythium* sp. frente a dos cepas de *T. saturnisporum*.

Frente a *Pythium* sp., el poder inhibitorio de ambos aislados de *Trichoderma* es muy bajo, no mostrando ninguno de los tratamientos valores de inhibición por encima del 4% (Foto n° 13). Los tratamientos esterilizados a altas concentraciones muestran diferencias significativas con respecto al testigo para ambos aislados. En cambio, los % de inhibición se mantienen estables independientemente de la concentración en los tratamientos microfiltrados.



**Foto n° 13.** Crecimiento micelial de *Pythium* sp. sobre PDA con un 25% de extracto esterilizado del aislado T1 comparado con el testigo.

#### 5.2.8.1.2. Evaluación del crecimiento micelial de *Pythium* sp. frente a cuatro aislados de *P. variotii*

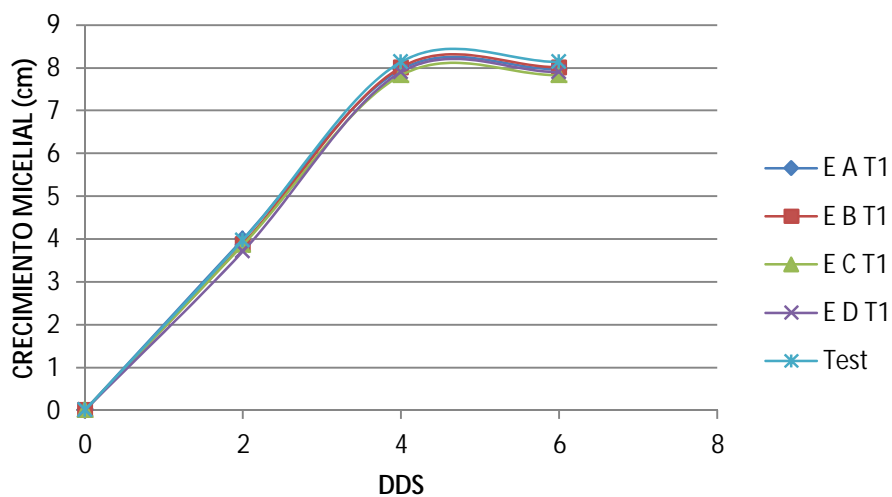


**Gráfica n° 82.** % de inhibición del crecimiento micelial de *Pythium* sp. frente a cuatro cepas de *P. variotii*.

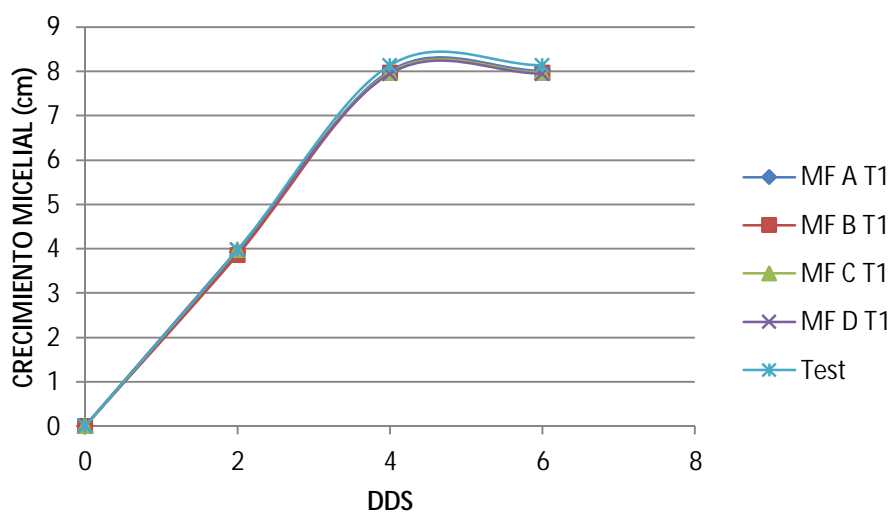
Se registra una acción inhibitoria prácticamente nula de los metabolitos frente a *Pythium* sp., observándose valores de inhibición no superiores al 4% en ninguno de los tratamientos. La mayoría de tratamientos no muestran diferencias significativas, según ANOVA SIMPLE, con respecto al testigo.

### 5.2.8.2. Evolución del crecimiento micelial

#### 5.2.8.2.1. Evolución del crecimiento micelial de *Pythium* sp. frente a dos aislados de *T. saturnisporum*

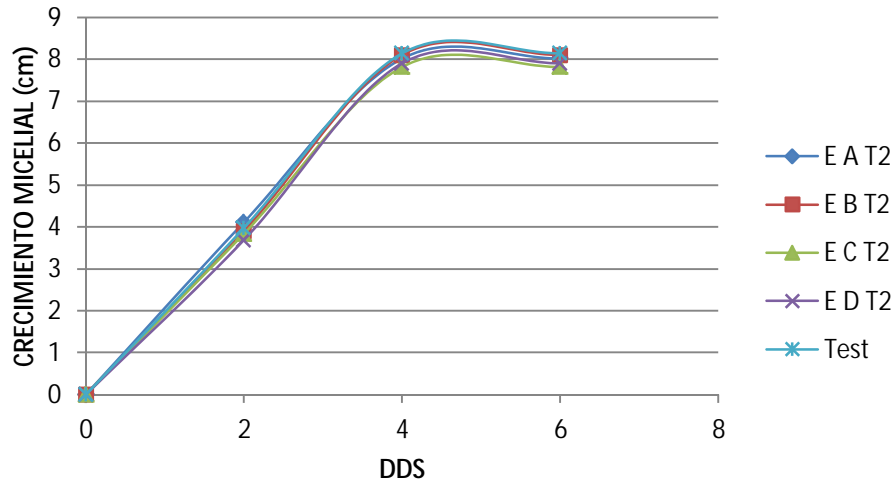


**Gráfica n° 83.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.

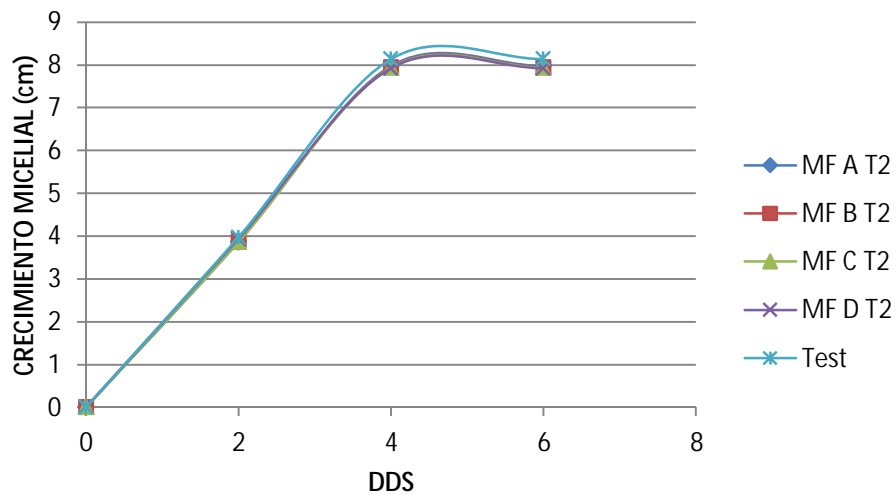


**Gráfica n° 84.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T1, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.





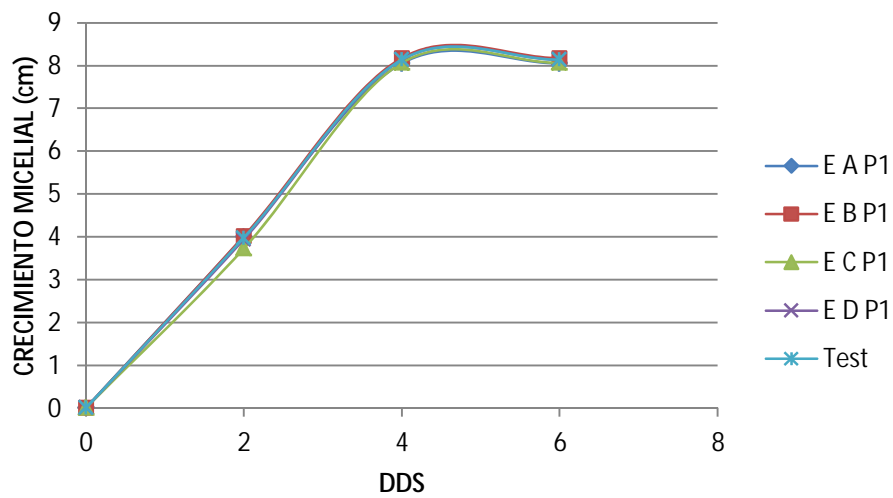
**Gráfica n° 85.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado T2, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.



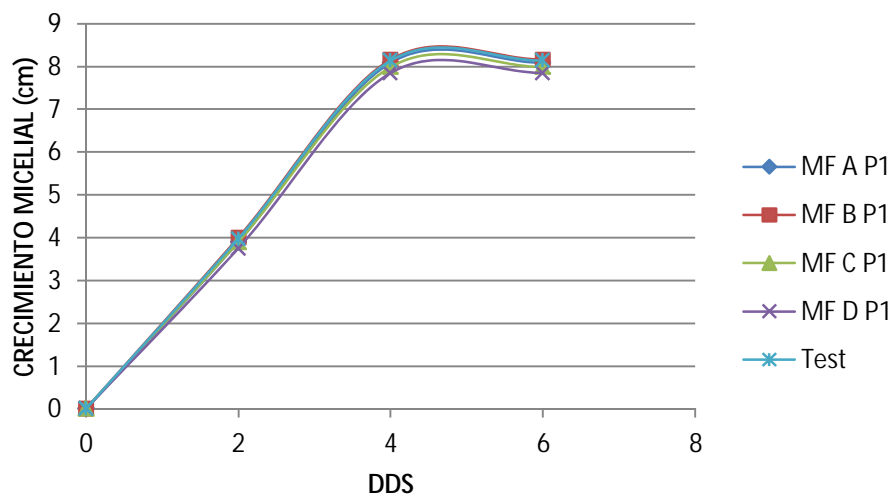
**Gráfica n° 86.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado T2, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.

No existen evidencias que demuestren la acción inhibitoria de los metabolitos solubles procedentes de los dos aislados de *T. saturnisporum* frente a *Pythium* sp.

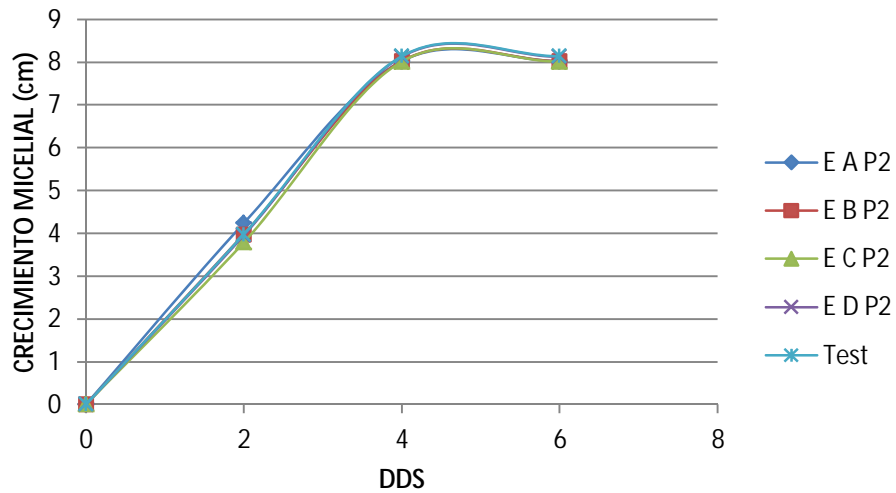
### 5.2.8.2.2. Evolución del crecimiento micelial de *Pythium* sp. frente a cuatro aislados de *P. variotii*



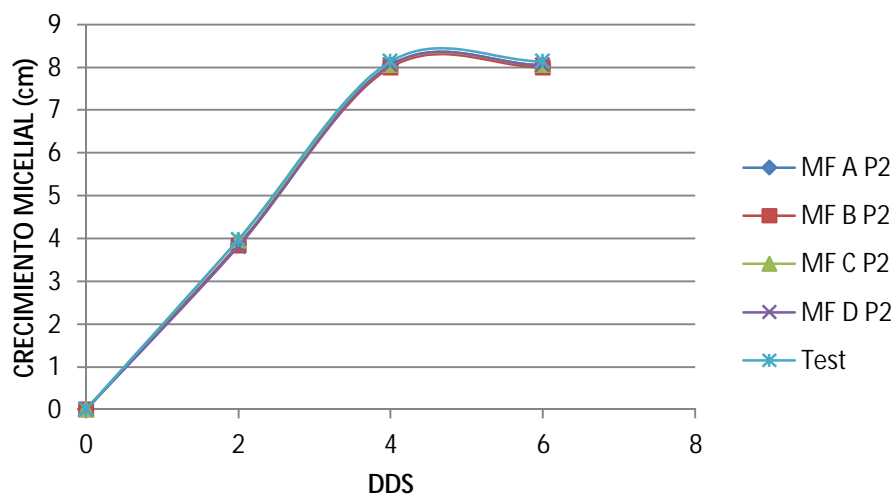
**Gráfica n° 87.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P1, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.



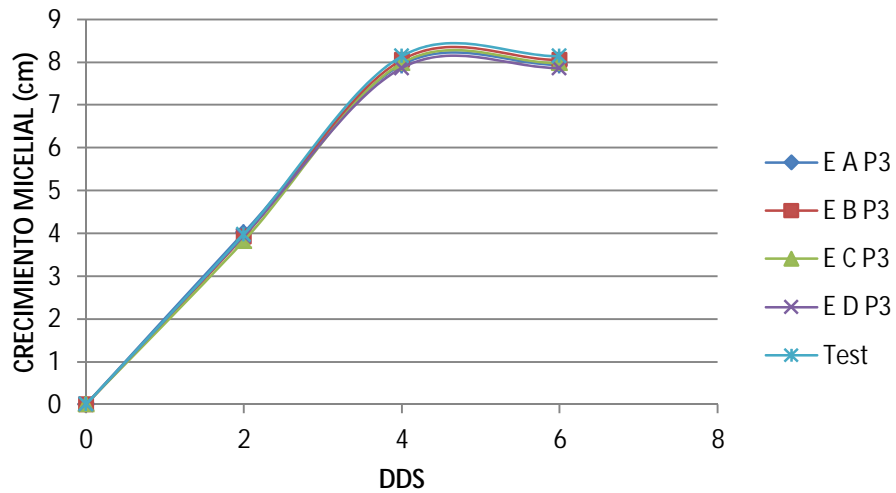
**Gráfica n° 88.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P1, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.



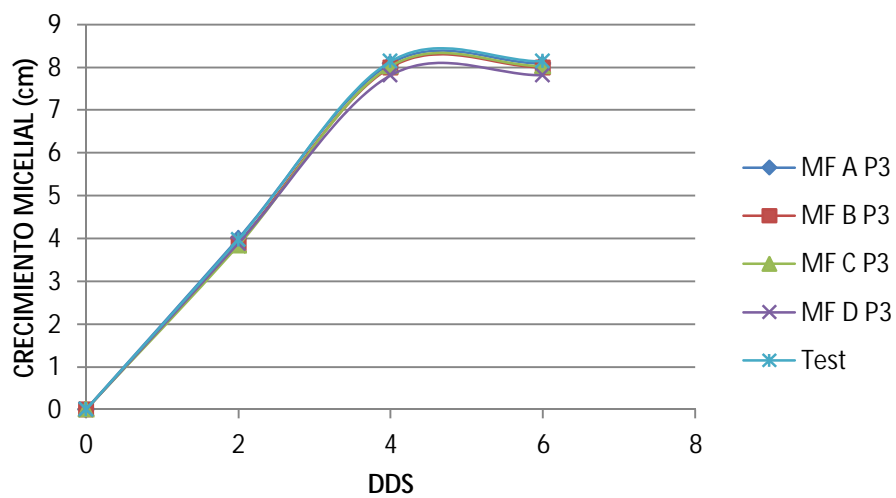
**Gráfica n° 89.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P2, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.



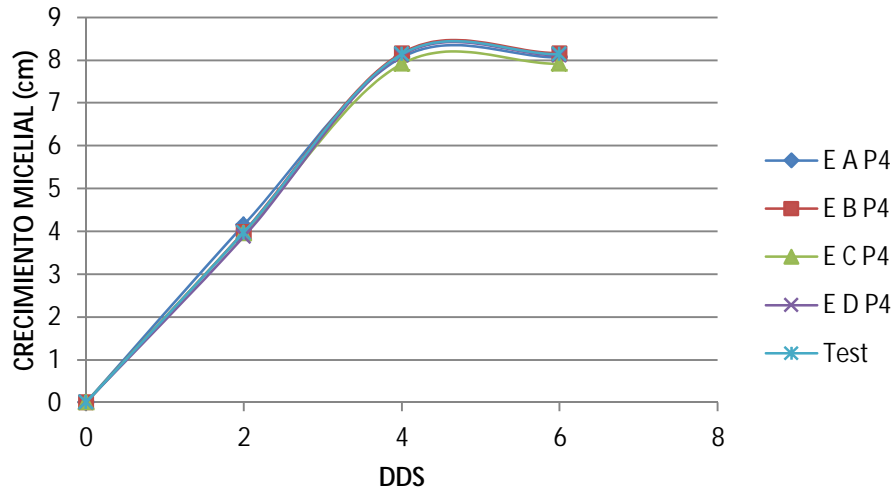
**Gráfica n° 90.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P2, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.



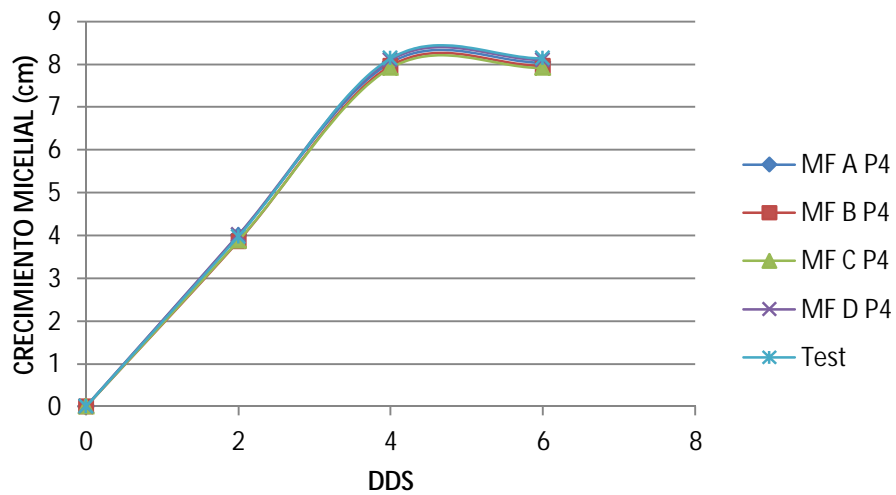
**Gráfica n° 91.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P3, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 92.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P3, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 93.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos esterilizados del aislado P4, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.



**Gráfica n° 94.** Crecimiento de *Pythium* sp. en PDA con diferentes tratamientos microfiltrados del aislado P4, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo) crecido en PDA.

Como puede observarse, la influencia de los aislados de *P. variotii* sobre el crecimiento *in vitro* de *Pythium* sp. es inexistente.

### 5.2.9. Resumen del ensayo sobre el efecto antagonista de los metabolitos no volátiles

En general, los porcentajes de inhibición han sido bastante bajos. Ninguno de los antagonistas ha superado un 30% de inhibición frente a alguno de los fitopatógenos. A pesar de ello, todos los microorganismos aislados han inducido cierto antagonismo sobre alguno de los fitopatógenos estudiados. A continuación se señalan los tratamientos que han conseguido provocar unas inhibiciones del 10% o superior (Cuadro nº 4), ya que por debajo de este valor la inhibición se considera poco efectiva (Lopes *et al.*, 2012).

Los aislados T1 y T2 presentan inhibiciones del 10% y 14 % frente a *F. o. f. sp. niveum*, respectivamente, así como P1, P2 y P3 que provocan una inhibiciones en torno al 12%.

Frente a *F. solani*, los aislados T1 y T2 presentan inhibiciones que rondan el 20%. El conjunto de aislados de *P. variotii* también inducen entre un 13-18% de inhibición.

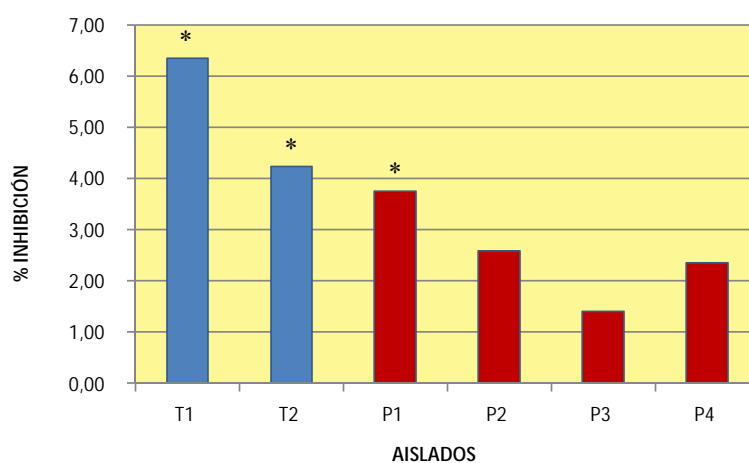
	<i>F. o. f.sp. niveum</i>	<i>F. solani</i>
<b>T1</b>	10%	20%
<b>T2</b>	14%	18%
<b>P1</b>	12%	15%
<b>P2</b>	11%	14%
<b>P3</b>	11%	18%
<b>P4</b>		13%

**Cuadro nº 4.** Resumen del ensayo sobre el efecto de los metabolitos.

### 5.3. EFECTO ANTAGONISTA DE LOS METABOLITOS VOLÁTILES

#### 5.3.1. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a *F. o. f. sp. niveum*

##### 5.3.1.1. Inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* frente a los microorganismos aislados



**Gráfica n° 95.** % de inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados.

Los aislados estudiados en este ensayo provocan una leve inhibición del crecimiento *in vitro* de *F. o. f. sp. niveum*, observándose unos % de inhibición inferiores al 4% para la mayoría de aislados, y algo superior, un 6%, para el aislado T1 (Foto n° 14). Ambos aislados de *Trichoderma*, así como P1, presentan diferencias significativas con respecto al testigo (nivel de confianza 95%).

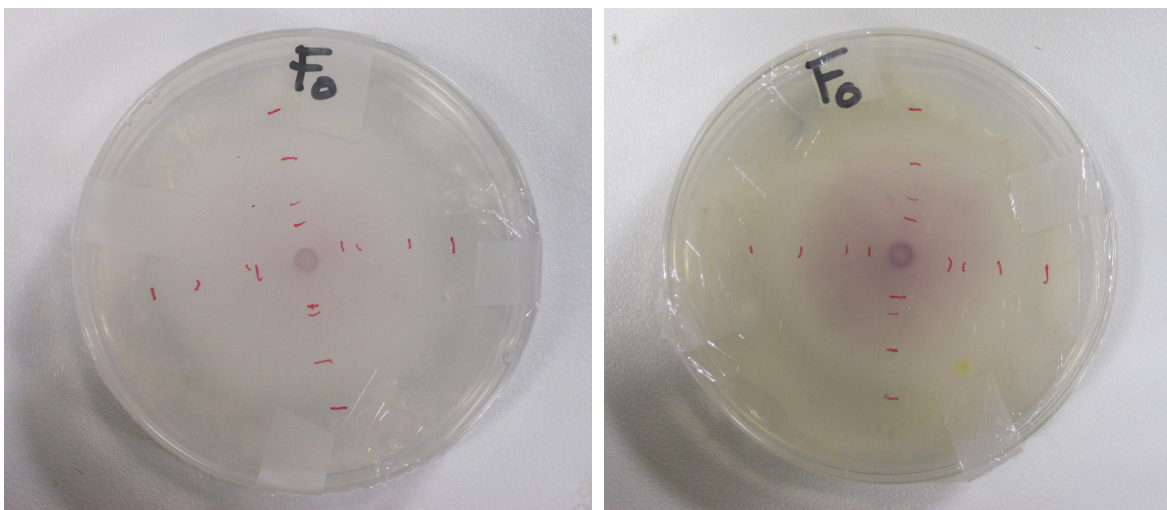
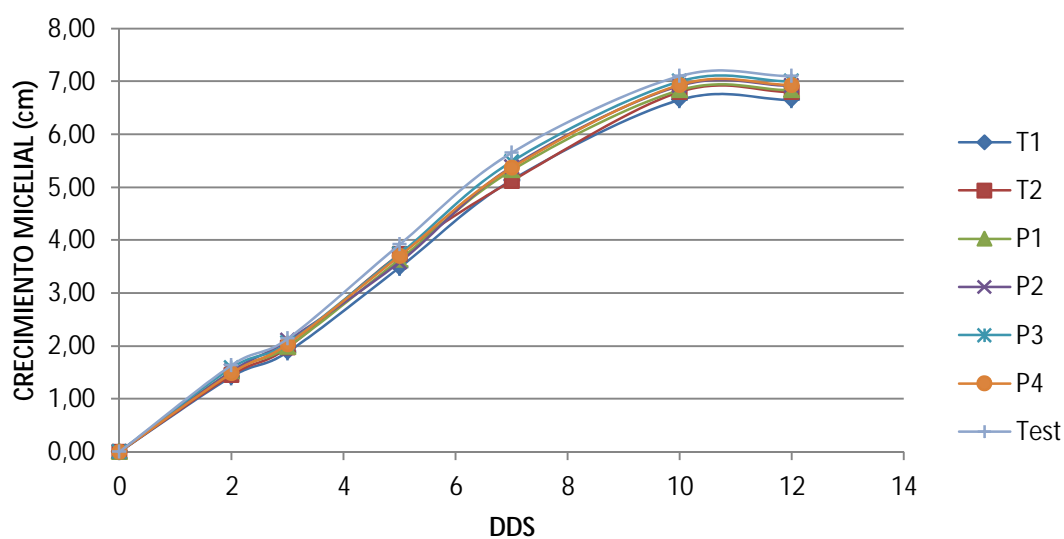


Foto n° 14. Crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* frente al aislado T1 comparado con el testigo.

### 5.3.1.2. Evolución del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. niveum* frente a los microorganismos aislados



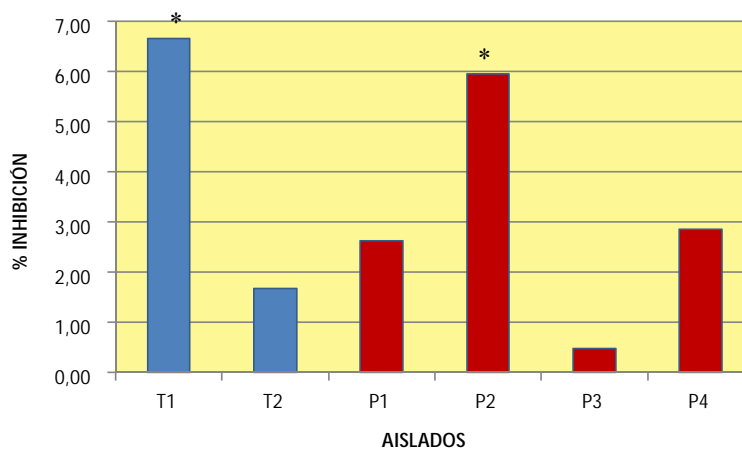
Gráfica n° 96. Crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* frente a los diversos aislados, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. niveum* (testigo).

La presencia de metabolitos volátiles de los aislados seleccionados apenas originan una alteración en el crecimiento *in vitro* de *F. o. f. sp. niveum*.



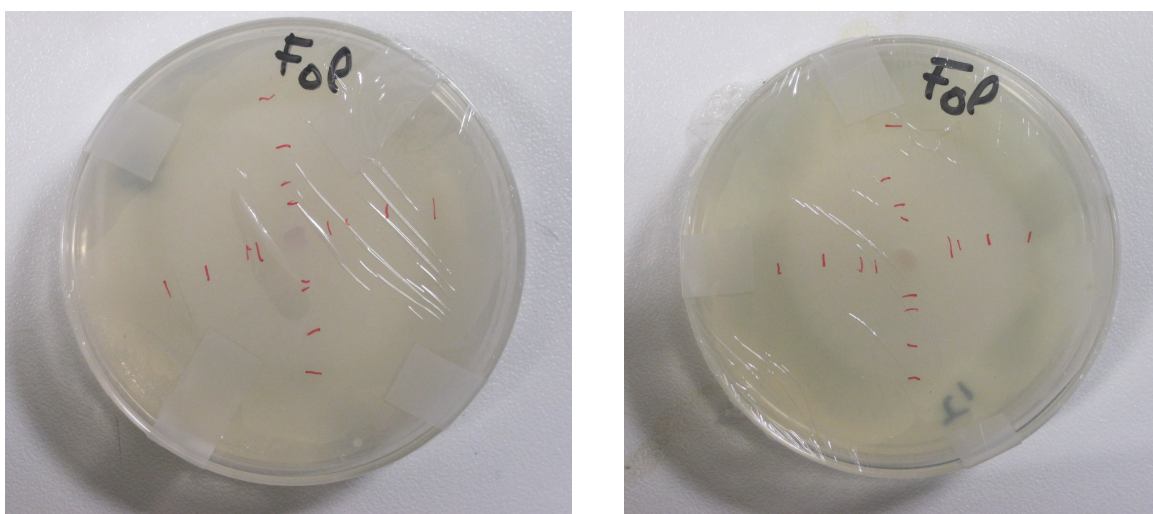
### 5.3.2. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a *F. o. f. sp. lycopersici*

#### 5.3.2.1. Inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici* frente a los microorganismos aislados



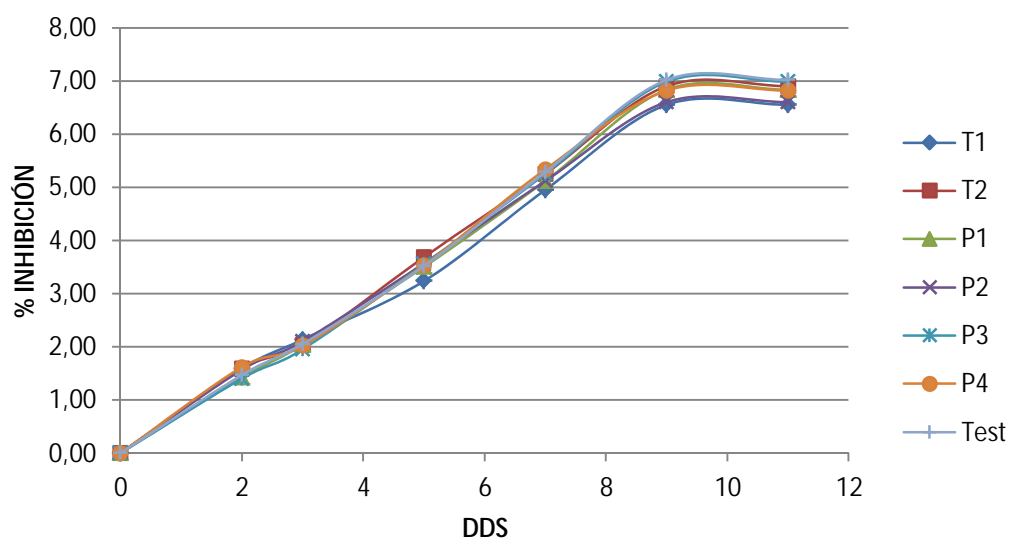
**Gráfica n° 97.** % de inhibición del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici* frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados.

Frente a *F. o. f. sp. lycopersici*, los % de inhibición del crecimiento micelial se sitúan en valores muy bajos, observándose valores por debajo del 3% para los aislados T2, P1 y P3, y no superiores al 7% para los aislados T1 y P2, los cuales muestran diferencias significativas con respecto al testigo (LSD 95%) (Foto n° 15).



**Foto n° 15.** Crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici* frente al aislado T1 comparado con el testigo.

### 5.3.2.2. Evolución del crecimiento micelial de *F. o. f. sp. lycopersici* frente a los microorganismos aislados

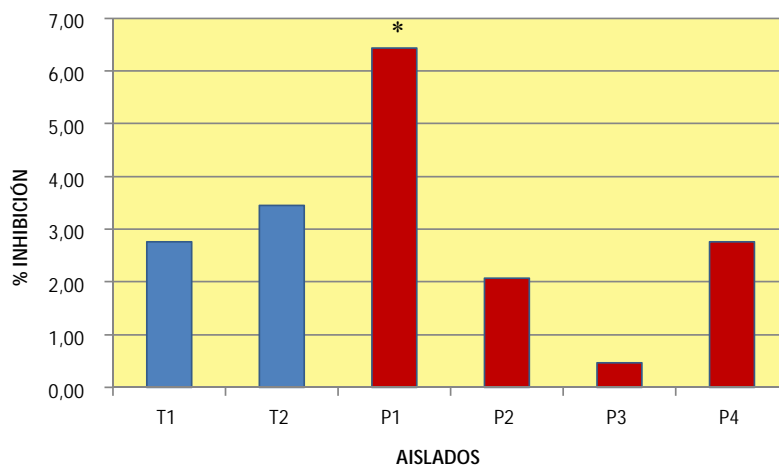


**Gráfica nº 98.** Crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* frente a los diversos aislados, comparado con el crecimiento de *F. o. f. sp. lycopersici* (testigo).

El crecimiento *in vitro* de *F. o. f. sp. lycopersici* no se ve inhibido por la presencia de metabolitos volátiles de los aislados utilizados en este ensayo. Tan sólo T1 y P2 muestran un leve efecto inhibitor del crecimiento.

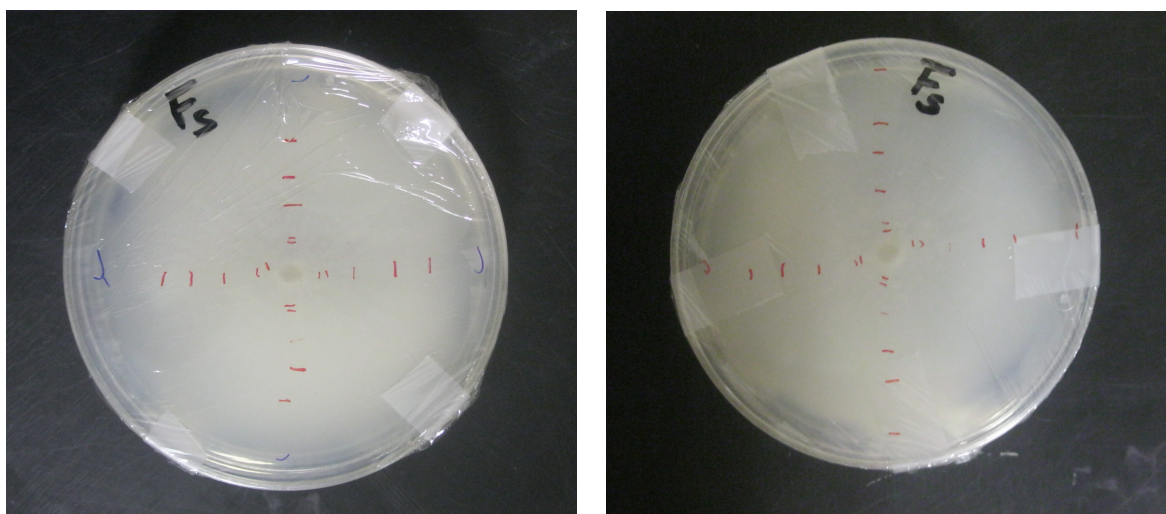
### 5.3.3. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a *F. solani*

#### 5.3.3.1. Inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* frente a los microorganismos aislados



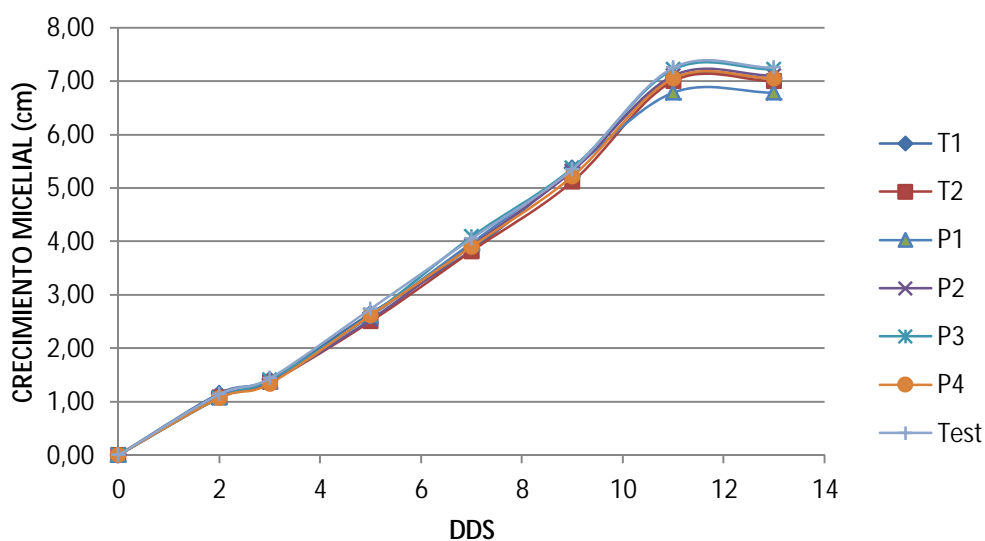
**Gráfica n° 99.** % de inhibición del crecimiento micelial de *F. solani* frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados.

Los metabolitos volátiles producidos por los diversos aislados presentan una leve influencia en el crecimiento micelial de *F. solani*. El % de inhibición medio se sitúa en torno al 3% (Foto n° 16), aunque el aislado P1, con un % de inhibición cercano al 7%, muestra diferencias significativas según ANOVA SIMPLE.



**Foto n° 16.** Crecimiento micelial de *F. solani* frente al aislado P2 comparado con el testigo.

### 5.3.3.2. Evolución del crecimiento micelial de *F. solani* frente a los microorganismos aislados

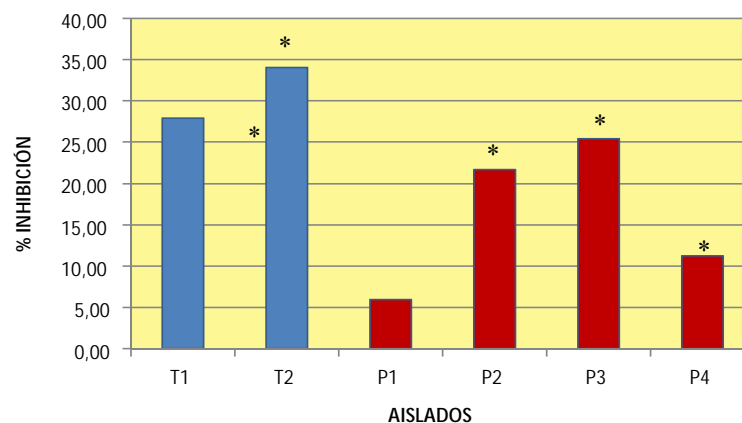


**Gráfica nº 100.** Crecimiento de *F. solani* frente a los diversos aislados, comparado con el crecimiento de *F. solani* (testigo).

Los metabolitos secundarios volátiles no ejercen ningún efecto inhibitorio del crecimiento micelial de *F. solani*, desarrollándose éste sin problemas, aunque el aislado P1 parece provocar una leve inhibición.

### 5.3.4. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a *D. bryoniae*

#### 5.3.4.1. Inhibición del crecimiento micelial de *D. bryoniae* frente a los microorganismos aislados



**Gráfica n° 101.** % de inhibición del crecimiento micelial de *D. bryoniae* frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados.

La mayoría de los aislados provocan unos considerables % de inhibición del crecimiento *in vitro* de *D. bryoniae*. Por un lado, los aislados P1 y P4 muestran valores alrededor del 5% y 10%, respectivamente, mientras que los aislados P2 y P3 alcanzan cotas del 20-25%. Los mayores % de inhibición los presentan los aislados T1 y T2, con porcentajes de inhibición del 27% y 34%, respectivamente (Foto n° 17). Menos P1, el total de aislados han mostrado diferencias significativas respecto al testigo (LSD 95%).

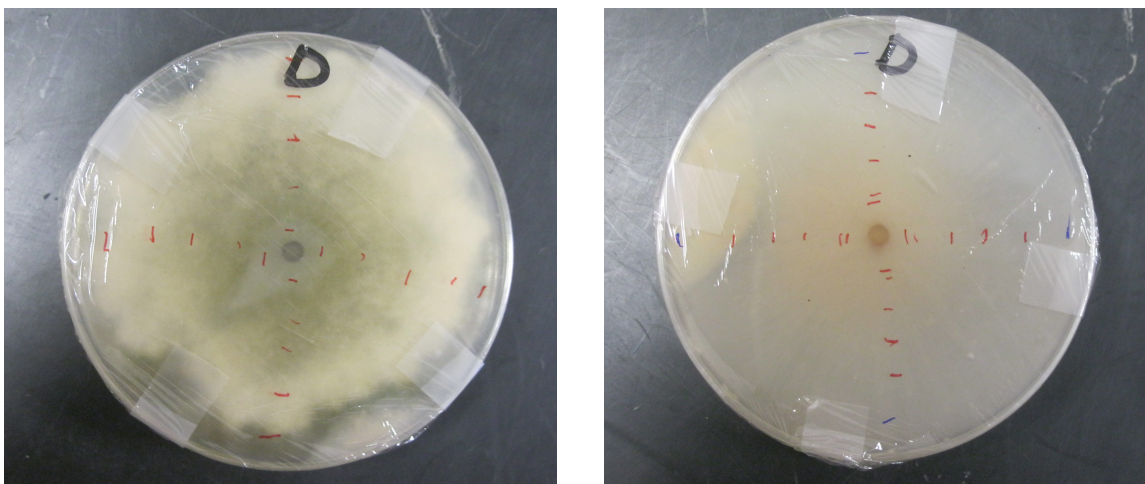
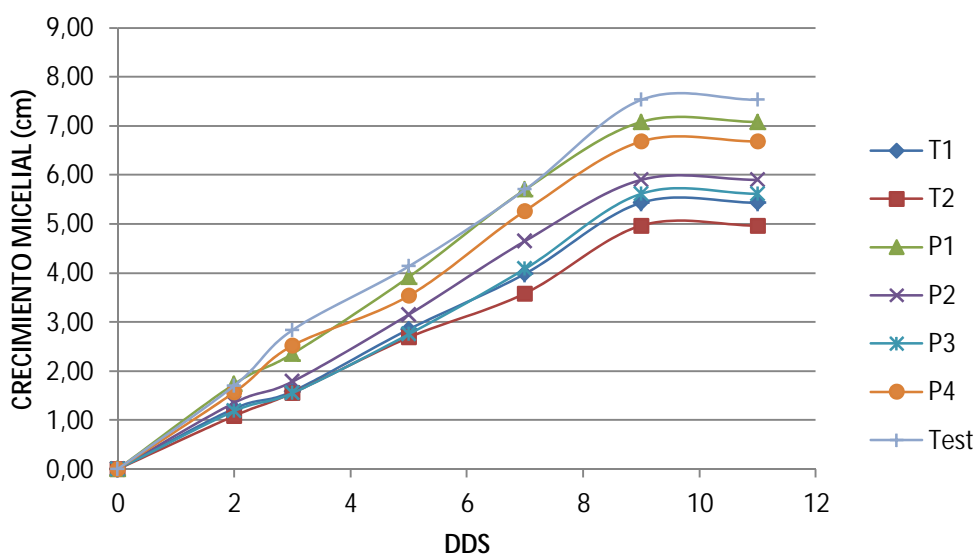


Foto n° 17. Crecimiento micelial de *D. bryoniae* frente al aislado T2 comparado con el testigo.

### 5.3.4.2. Evolución del crecimiento micelial de *D. bryoniae* frente a los microorganismos aislados



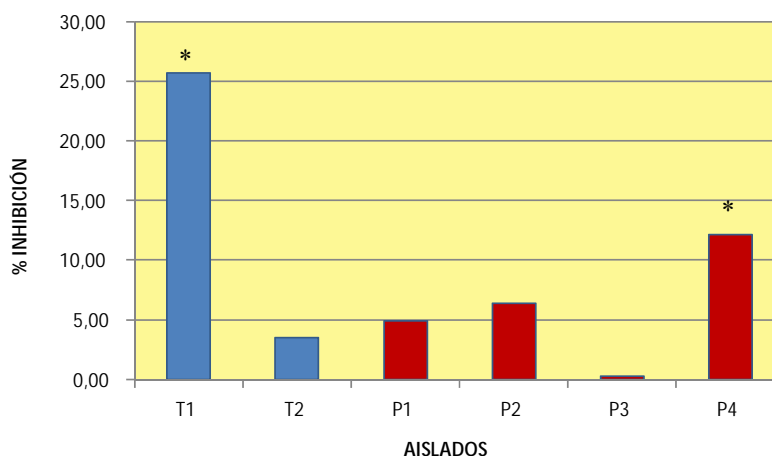
Gráfica n° 102. Crecimiento de *D. bryoniae* frente a los diversos aislados, comparado con el crecimiento de *D. bryoniae* (testigo).

Frente a *D. bryoniae*, los metabolitos volátiles de los microorganismos ensayados de *Trichoderma* y *Paecilomyces* originan una notable inhibición del crecimiento *in vitro*. Es de resaltar la ralentización del crecimiento del patógeno provocada sobretodo por los aislados T1, T2, P2 y P3 desde el inicio del ensayo.



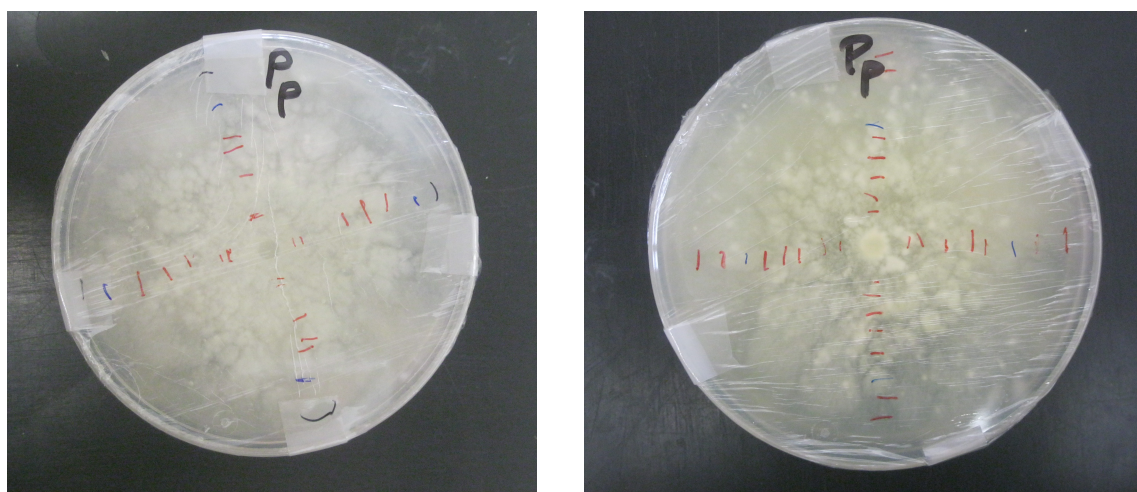
### 5.3.5. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a *P. parasitica*

#### 5.3.5.1. Inhibición del crecimiento micelial de *P. parasitica* frente a los microorganismos aislados



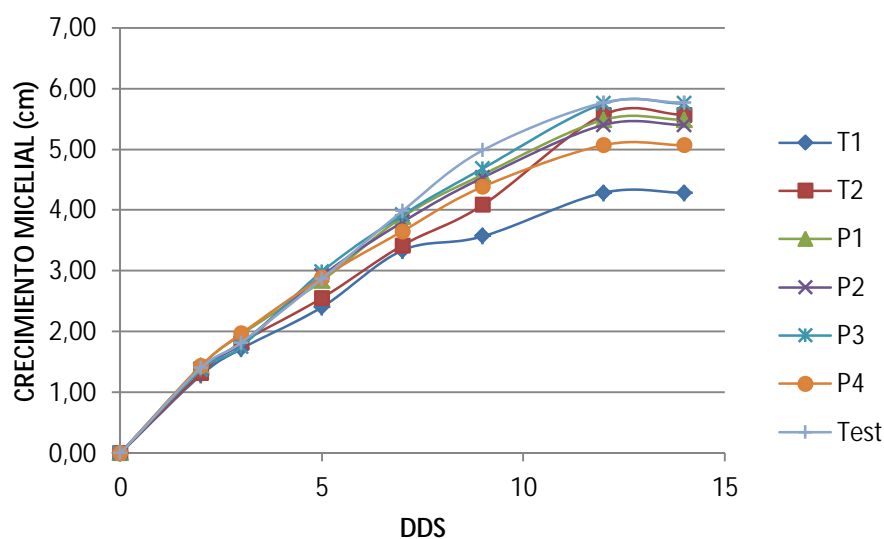
**Gráfica n° 103.** % de inhibición del crecimiento micelial de *P. parasitica* frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados.

La mayoría de aislados no supera el 10% de inhibición frente a *P. parasitica*. En cambio, el aislado T1 y P4, los cuales muestran diferencias significativas con respecto al testigo, provocan un importante efecto inhibitorio sobre el crecimiento *in vitro* de *P. parasitica*, con unos porcentajes de inhibición del 25% y 12%, respectivamente (Foto n° 18).



**Foto n° 18.** Crecimiento micelial de *P. parasitica* frente al aislado T1 comparado con el testigo.

### 5.3.5.2. Evolución del crecimiento micelial de *P. parasitica* frente a los microorganismos aislados



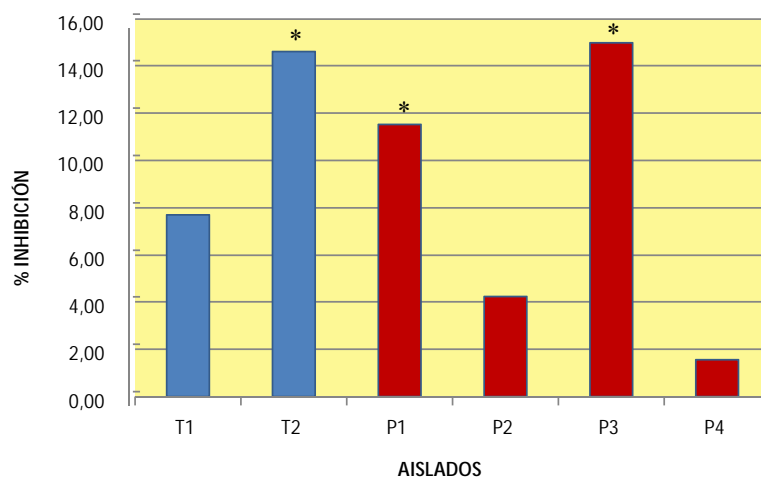
**Gráfica n° 104.** Crecimiento de *P. parasitica* frente a los diversos aislados, comparado con el crecimiento de *P. parasitica* (testigo).

*P. parasitica* se desarrolla con normalidad en presencia de las sustancias volátiles originadas por la mayoría de los aislados ensayados. En cambio, los metabolitos del aislado T1 provocan una notable alteración en su crecimiento. La inhibición se produce cuando el micelio de T1 se ha desarrollado considerablemente. P4 también muestra cierto efecto inhibitorio del crecimiento micelial *in vitro* de *P. parasitica*.



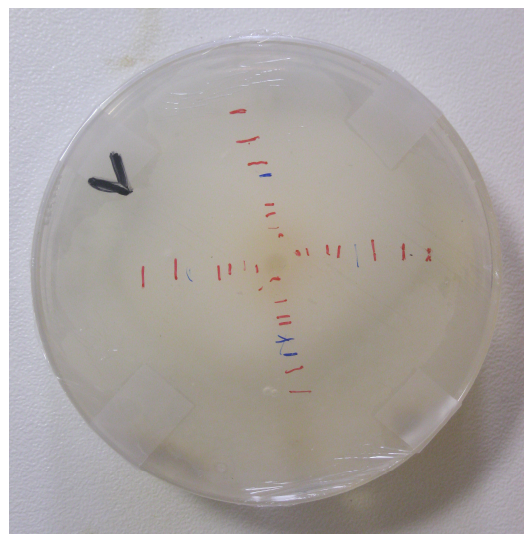
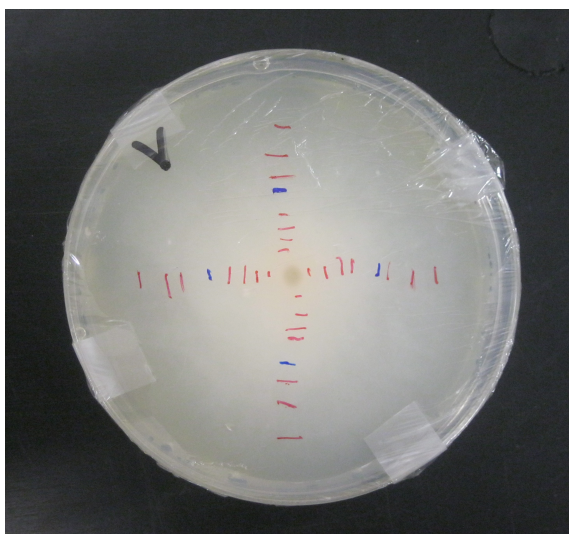
### 5.3.6. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a *V. dahliae*

#### 5.3.6.1. Inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* frente a los microorganismos aislados



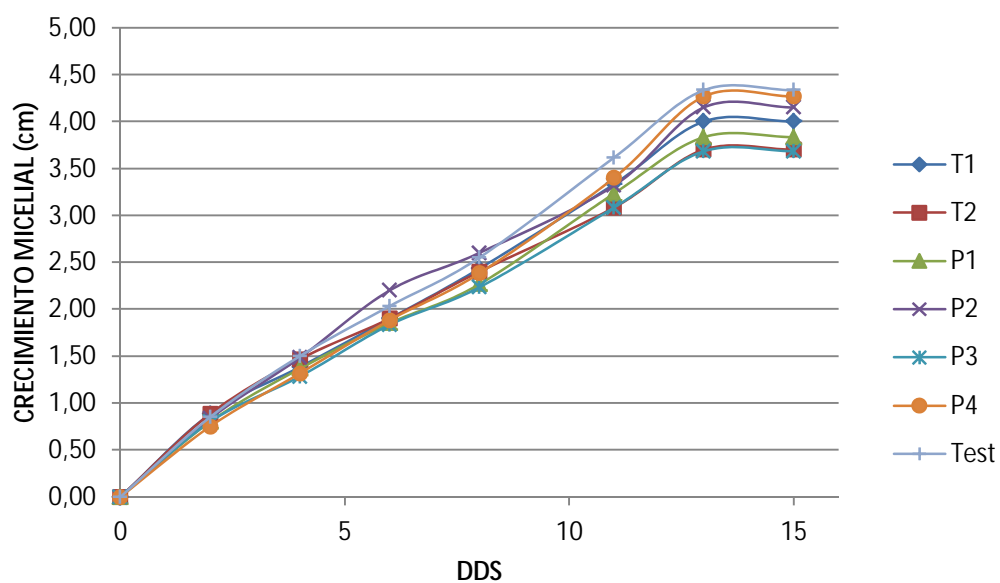
**Gráfica n° 105.** % de inhibición del crecimiento micelial de *V. dahliae* frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados.

Frente a *V. dahliae*, se pueden observar unos moderados % de inhibición para algunos de los aislados, en torno al 12-14% (Foto n° 19). Los aislados T1, P2 y P4 presentan unos % de inhibición considerablemente inferiores, no presentando éstos diferencias significativas con respecto al testigo (LSD 95%).



**Foto n° 19.** Crecimiento micelial de *V. dahliae* frente al aislado P1 comparado con el testigo.

### 5.3.6.2. Evolución del crecimiento micelial de *V. dahliae* frente a los microorganismos aislados

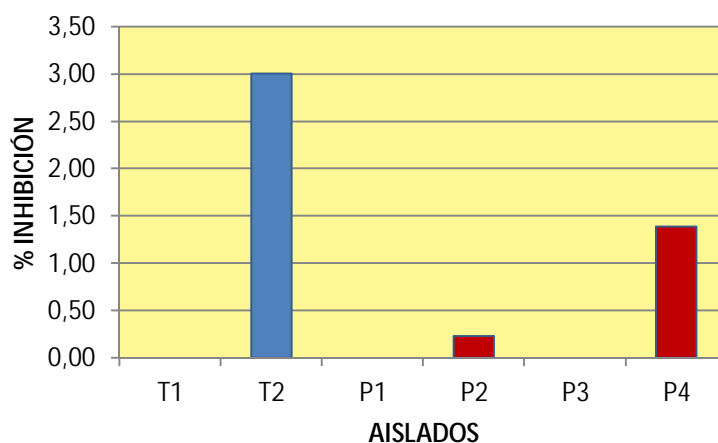


**Gráfica n° 106.** Crecimiento de *V. dahliae* frente a los diversos aislados, comparado con el crecimiento de *V. dahliae* (testigo) crecido en ausencia de otros microorganismos.

Casi todos los aislados muestran algún grado de inhibición sobre *V. dahliae*, destacando T2, P1 y P3, con un efecto inhibitorio que se presenta ya en un estado avanzado del crecimiento del patógeno (Gráfica n° 106).

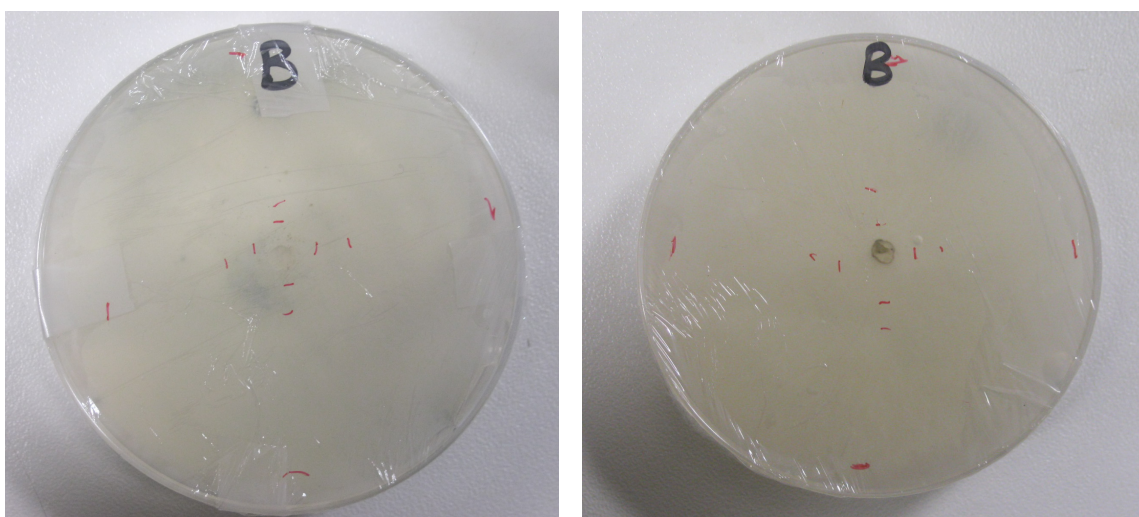
### 5.3.7. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a *B. cinerea*

#### 5.3.7.1. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* frente a los microorganismos aislados



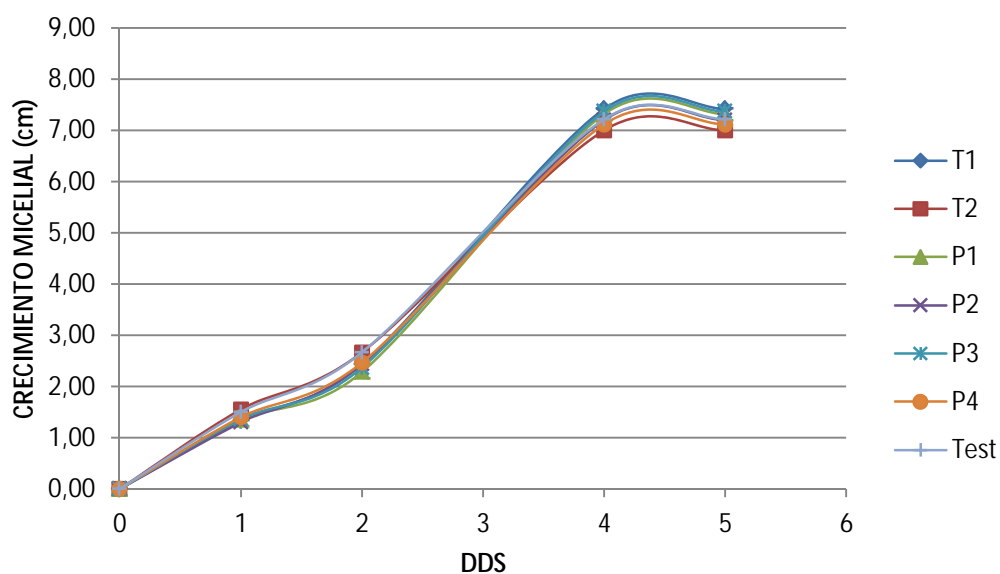
**Gráfica n° 107.** % de inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados.

Ninguno de los aislados seleccionados muestra evidencias de un efecto negativo sobre el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*, ya que ninguno de ellos presenta diferencias significativas con respecto al testigo (Foto n° 20).



**Foto n° 20.** Crecimiento micelial de *B. cinerea* en frente al aislado P3 comparado con el testigo.

### 5.3.7.2. Evolución del crecimiento micelial de *B. cinerea* frente a los microorganismos aislados

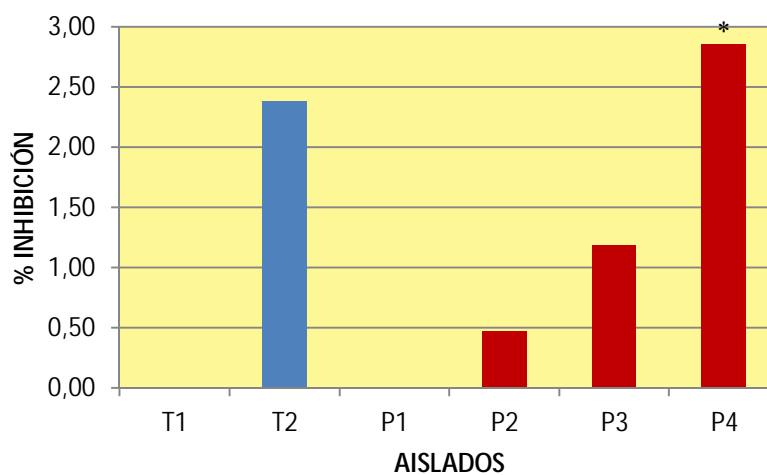


**Gráfica nº 108.** Crecimiento de *B. cinerea* frente a los diversos aislados, comparado con el crecimiento de *B. cinerea* (testigo).

Los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados no presentan ningún efecto antagonista sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea* (gráfica nº 77).

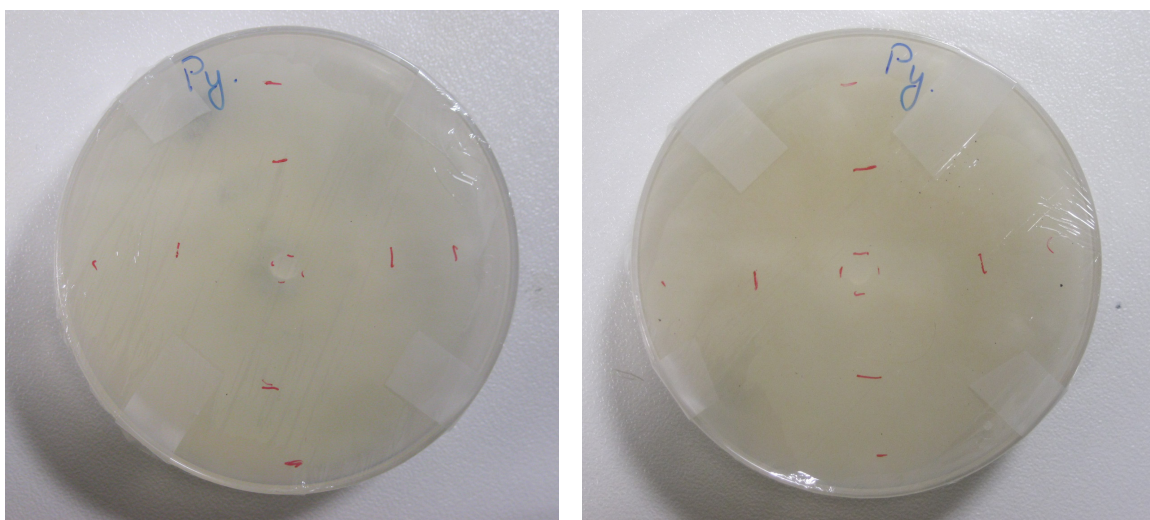
### 5.3.8. Evaluación del efecto antagonista de los metabolitos volátiles producidos por los aislados frente a *Pythium* sp.

#### 5.3.8.1. Inhibición del crecimiento micelial de *Pythium* sp. frente a los microorganismos aislados



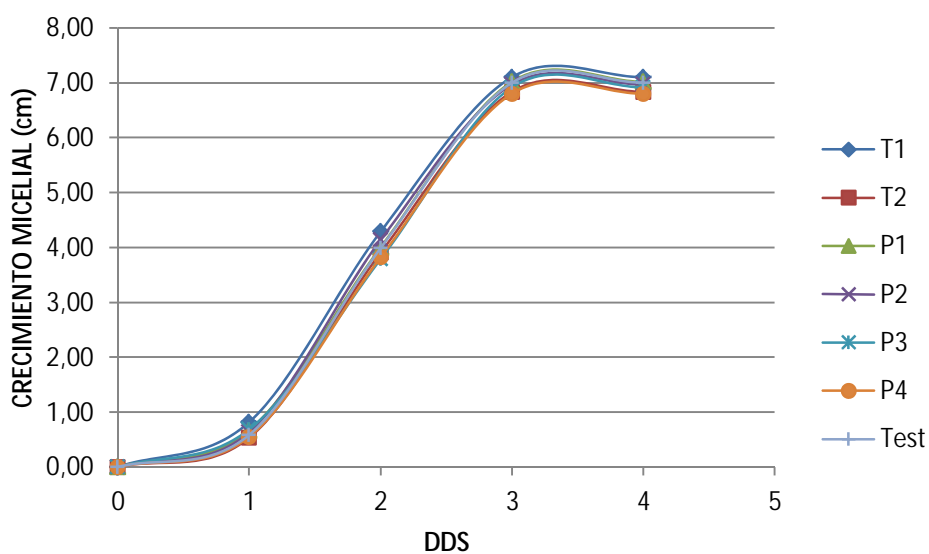
**Gráfica n° 109.** % de inhibición del crecimiento micelial de *Pythium* sp. frente a los metabolitos volátiles de los aislados seleccionados.

Frente a *Pythium* sp., los % de inhibición que presentan los diversos aislados son desestimables (Foto n° 21). Tan sólo el aislado P4 ha presentado diferencias significativas, según ANOVA SIMPLE, aunque no ha superado el 3% de inhibición *in vitro*.



**Foto n° 21.** Crecimiento micelial de *Pythium* sp. frente al aislado P3 comparado con el testigo.

### 5.3.8.2. Evolución del crecimiento micelial de *Pythium* sp. frente a los microorganismos aislados



**Gráfica n° 110.** Crecimiento de *Pythium* sp. frente a los diversos aislados, comparado con el crecimiento de *Pythium* sp. (testigo).

El crecimiento de *Pythium* sp. no se ve afectado por la presencia de metabolitos volátiles de los aislados seleccionados.

### 5.3.9. Resumen del ensayo sobre el efecto antagonista de los metabolitos volátiles

A continuación se pueden observar los aislados que han conseguido un porcentaje de inhibición igual o superior al 10% (Cuadro n° 5).

Los metabolitos volátiles de los aislados T1 y T2 presentan unos % de inhibición del 27% y 34% respectivamente frente a *D. bryoniae*. Así mismo, los aislados P2, P3 y P4 provocan unas inhibiciones del 21% ,25% y 11%, respectivamente.

Frente a *P. parasitica*, el aislado T1 induce un 25% de inhibición, mientras que el aislado P4 produce una inhibición del 12%.

El aislado T2 presenta un 14% de inhibición frente a *V. dahliae*, así como P1 y P3, los cuales provocan unas inhibiciones del 11% y 15% respectivamente.

	<i>D. bryoniae</i>	<i>P. parasitica</i>	<i>V. dahliae</i>
T1	27%	25%	
T2	34%		14%
P1			11%
P2	21%		
P3	25%		15%
P4	11%	12%	

Cuadro n° 5. Resumen del ensayo sobre el efecto de los metabolitos volátiles.

# Discusión



## 6.1. ENSAYO SOBRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS AISLADOS

La caracterización intraespecífica de los agentes de control biológicos mediante técnicas como la RAPD-PCR es esencial para la construcción de mecanismos de control de patógenos de calidad.

Kumar *et al.* (2010) han estudiado nueve aislados de *Trichoderma* sp., relacionando los patrones de RAPD-PCR con su capacidad para el control de *F. o. f. sp. psidii* y *F. solani*. Gomez *et al.* (1997) analizaron los perfiles obtenidos mediante RAPD-PCR de aislados de *T. harzianum* y los clasificaron en diferentes grupos de acuerdo a su habilidad para el control de fitopatógenos. También ha sido utilizada para estudiar la variabilidad genética en relación a la procedencia geográfica de 145 aislados de *T. longibrachiatum* (Turner *et al.*, 1997). Asimismo, la técnica RAPD-PCR fue utilizada por Bokhari y Gherbawy (2009) para detectar el potencial de producción de patulina de siete aislados de *P. variotii*, observando variabilidad en los perfiles de RAPD.

En este presente ensayo se ha estudiado la variabilidad genética existente entre los aislados observando las variaciones en los patrones de bandas obtenidos mediante RAPD-PCR.

Los patrones de bandas realizada a los dos aislados del género *Trichoderma* muestran diferencias en distribución de las bandas e intensidad de éstas para todos los cebadores utilizados. Los resultados arrojados por el estudio nos indican que existe variabilidad genética entre los dos aislados de *T. saturnisporum*, ya que se encuentran diferencias entre los patrones de bandas de ambos, por lo que pertenecen a cepas distintas de dicha especie.

En cuanto a los aislados del género *Paecilomyces*, los patrones de bandas de P3 y P4 son idénticos. Las bandas de todos los patrones utilizados coinciden en intensidad y distribución, por lo que pertenecen a una misma cepa de *P. variotii*. En cambio, los aislados P1 y P2 presentan diferencias entre sí y entre P3 y P4, observándose variabilidad en cuanto a intensidad de las bandas y a distribución de éstas, desapareciendo algunas o

incluso apareciendo otras, por lo que dichos aislados presentan variabilidad genética entre ellos, perteneciendo a distintas cepas de *P. variotii*.

Aislado	Especie	Cepa
T1	<i>T. saturnisporum</i>	Cepa Tricho A
T2	<i>T. saturnisporum</i>	Cepa Tricho B
P1	<i>P. variotii</i>	Cepa Pae A
P2	<i>P. variotii</i>	Cepa Pae B
P3	<i>P. variotii</i>	Cepa Pae C
P4	<i>P. variotii</i>	Cepa Pae C

**Cuadro n° 6.** Resultados del ensayo sobre variabilidad genética.

## 6.2. ENSAYO SOBRE EL EFECTO ANTAGONISTA DE LOS METABOLITOS NO VOLÁTILES

La literatura científica apenas registra estudios del efecto antagonista de *T. saturnisporum*. Existe algún ensayo, como el realizado por Ajith y Lakshmidivin (2010), donde se demuestra que los metabolitos no volátiles de *T. saturnisporum* inducen unas inhibiciones moderadas sobre *Colletotricum capsici*.

Otras especies de *Trichoderma*, como *T. viride*, *T. virens* y *T. harzianum*, sí han sido estudiadas en numerosas ocasiones, habiéndose demostrado que sus metabolitos secundarios no volátiles tiene un marcado efecto antagonista sobre *F. solani*, *P. aphanidermatum*, *B. cinerea*, entre otros (Chakraborty y Chatterjee, 2008; Muthukumar *et al.*, 2011; Vinale *et al.*, 2009).

El presente ensayo demuestra que existen metabolitos secundarios producidos por los aislados estudiados de *T. saturnisporum*, T1 y T2, que provocan un moderado efecto

inhibidor del crecimiento micelial sobre *F. o. f. sp. niveum* (10% y 14%, respectivamente). Estos mismos aislados presentan también cierto grado de antagonismo *in vitro* frente a *F. solani*, observándose inhibiciones del crecimiento micelial entre el 18% y 20%.

En cuanto a los aislados de *P. variotii*, existe multitud de literatura donde se estudia a esta especie como entomopatógeno, pero no como antagonista de enfermedades fúngicas. Todos los aislados estudiados de esta especie originan una moderada inhibición frente a *F. solani* que se sitúa entre el 13-18%. Tanto P1, como P2 y P3 ocasionan además alrededor de un 11% de inhibición sobre *F. o. f. sp. niveum*.

### **6.3. ENSAYO SOBRE EL EFECTO ANTAGONISTA DE LOS METABOLITOS VOLÁTILES**

Existe algún trabajo, como el de Ajith y Lakshmidēvi (2010), donde se estudia el efecto antagonista de *T. saturnisporum*, en este caso sobre *C. capsici*. En el ensayo se demuestra que los compuestos volátiles producidos por éste provocan un 60% de inhibición frente a *C. capsici*.

*T. saturnisporum* no es un hongo que haya sido ampliamente estudiado como ACB, por lo que los estudios relacionados con éste son bastante escasos. En cambio, numerosos investigadores han presentado evidencias del efecto antagonista de los metabolitos volátiles de *T. harzianum*, *T. viride* y *T. virens*. Según estudios realizados por Chakraborty y Chatterjee (2008), los metabolitos volátiles producidos por *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum* y *T. reesi* tienen la capacidad de inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de *F. solani* en un 44-78%. El potencial antagonista de los metabolitos volátiles de otras especies de *Trichoderma*, como *T. velutinsum* y *T. gamsii*, ha sido estudiadas por Annes *et al.* (2010), no observándose inhibiciones significativas frente a *Rhizoctonia solani*. Estudios realizados por Lopes *et al.* (2012) demuestran el potencial antagonista de los metabolitos volátiles de *T. koningiopsis* y *T. asperellum* que alcanzan cotas de inhibición del 40-55% frente a *Sclerotinia sclerotiorum*.

Los dos aislados ensayados de *T. saturnisporum* producen un moderado efecto inhibidor del crecimiento micelial frente *D. bryoniae*, causando unas inhibiciones del 27%

y 34%, respectivamente. T1 además inhibe a *P. parasitica* en un 25% y T2 tiene un potencial de inhibición algo menor frente a *V. dahliae*, con un 14% de inhibición micelial.

Las inhibiciones provocadas por los aislados de *P. variotii* son algo menores, observándose también cierto antagonismo frente a *D. bryoniae*, *P. parasitica* y *V. dahliae*. P1 muestra un 11% de inhibición frente a *V. dahliae*. P2 y P4 inducen una moderada inhibición del 21% y 11%, respectivamente, sobre *D. bryoniae*. El aislado P3 tiene un efecto antagonista sobre *D. bryoniae* y *V. dahliae* del 25% y 15%, respectivamente. Frente a *P. parasitica*, el aislado P4 induce un 12% de inhibición micelial.

# Conclusiones

## 7.1. Conclusiones

1. Los dos aislados analizados de *Trichoderma* sp. identificados mediante PCR pertenecen a la especie *Trichoderma saturnisporum*. La técnica RAPD-PCR ha demostrado que estos aislados presentan variabilidad genética entre sí, procediendo de cepas distintas de dicha especie.

Los cuatro aislados estudiados de *Paecilomyces* sp. pertenecen a la especie *Paecilomyces variotii*. Los aislados P3 y P4 forman parte de la misma cepa de esta especie, ya que no existe variabilidad genética entre ambos aislados. En cambio, los aislados P1 y P2 presentan variabilidad genética entre sí y entre P3 y P4, por lo que pertenecen a cepas distintas.

2. Los metabolitos secundarios no volátiles procedentes de los aislados estudiados de *T. saturnisporum*, T1 y T2, inducen unas inhibiciones del 10% y 14%, respectivamente, frente a *F. o. f.sp. niveum* y del 20% sobre *F. solani*.

Asimismo, los aislados P1, P2 y P3 provocan un 11% de inhibición micelial frente a *F. o. f.sp. niveum*, y tanto éstos como P4 producen una inhibición *in vitro* sobre *F. solani* que se sitúan entre el 13-18%.

3. Los metabolitos volátiles de los aislados T1 y T2 causan una moderada inhibición del 27-35% sobre *D. bryoniae*. T1, además, provoca la inhibición de *P. parasitica* en un 25% y *V. dahliae* es inhibido en un 14% por T2.

Los aislados P2 y P3 muestran entre un 21-25% de inhibición frente a *D. bryoniae*, así como P4, que origina un 11% de inhibición sobre *D. bryoniae*. P1 y P3 inhiben a *V. dahliae* en un 11% y 15%, respectivamente. *P. parasitica* es inhibido en un 12% frente al aislado P4.

# **Bibliografía**

**Ahmad J. S, Baker R.** (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 77: 182 - 189.

**Ajith P., Lakshmidhevi N.** (2010). Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of Anthracnose on Bell peppers. *Nature and Science*, 8: 265 - 269. (ISSN: 1545 - 0740).

**Alabouvette C.** (1986). *Fusarium* wilt-suppressive soils from Châteaurenard region: review of a 10 years study. *Agronomie*, 6: 273 - 284.

**Alabouvette C.** (1990). Biological control of *Fusarium* wilt pathogens in suppressive soils. En: *Biological control of soil borne plant pathogens*. CAB International, Wallingford, England, pp. 27 - 43.

**Alabouvette C., Lemanceau P, Steinberg X.** (1993). Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilt. *Pestic. Sci.* 37: 365 - 373.

**Altomare C., Norvell W., Björkman T., Harman G.** (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 1926 - 1933.

**Anees M., Tronsmo A., Edel-Hermann V., Hjeljord L. G., Héraud C., Steinberg C.** (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, 114: 691 - 701.

**Asaff A.** (2006). Producción de metabolitos insecticidas por *Paecilomyces fumosoroseus* en fermentación líquida y sólida. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.

**Atkinson G. F.** (1892). Some diseases of cotton. *Ala. Agric. Exp. Stn. Bull.* Pp. 41 - 65.

**Baker K. F., Cook R. J.** (1974). Biological control of plant pathogens. En: *The Biology of Plant Pathogens*. Ed. Freeman, San Francisco. pp. 433.

**Baker R., Chet I.** (1982). Induction of suppressiveness. En: *Suppressive soil and plant disease*. Schneider R. W. (Ed.). APS Press, St. Paul. Pp- 35 - 50.



- Becker J. O., Shwinn F. J.** (1993). Control soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook. *Pesticide Science*, 37: 355 - 363.
- Benítez T., Rincón A. M., Limón M. C., Codón A. C.** (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249 – 260.
- Björkman T., Blanchard L., Harman G.** (1998). Growth enhancement of shrunken-2 (sh2) sweet corn by *Trichoderma harzianum*. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 123 (1): 35 - 40.
- Blancard D.** (1988). Enfermedades del tomate: observar, identificar, luchar. INRA. 214 pp.
- Blancard D., Rafin F., Chamont S., Tirilly Y., Jailloux F.** (1991). Phénomène de perte de racines en culture hors sol. Rôle des *Pythium* spp. *PHM Revue Horticole*, 329: 35 - 45.
- Blanco M. A.** (1996). Micosis vasculares. Patología vegetal II. Ed. S.E.F. Madrid. pp 913-935.
- Bokhari F., Gherbawy Y.** (2009). Detection of the patulin-producing potencial of some *Paecilomyces variotii* strains isolated from the air samples of Jeddah City, Saudi Arabia, using the RAPD-PCR technique. *Aerobiologia*, 25: 49 – 54.
- Bordat D., Robert P., Renand M.** (1988). Susceptibility of *Liriomyza trifolii* (Burgues) and *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromycidae) to eleven strains of entomopathogenic fungi. *Agron Trop.*, 43 (1): 68 - 73.
- Bruna A., Tobar G.** (2004). Determinacion de *Phytophthora nicotianae*, causante del cancro del tallo de tomate. Chile.
- Bryan G. T., Daniels M. J., Osbourn A. E.** (1995). Comparison of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal DNA sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 681 - 689.
- Buchert J., Oksanen T., Pere J., Siika-aho M., Suurnakki A., Viikari L.** (1998). Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. En: Harman

---

G. F., Kubicek C. P., editors. *Trichoderma & Gliocladium—Enzymes, biological control and commercial applications*, 2: 34 - 63.

**CAB International**, Crop Protection Compendium. Wallingford, England, 2004.

**Campbell R.** (1994). Biological control of soil-borne diseases: some present problems and different approaches. *Crop protection*, 13: 4 - 13.

**Carballo M., Guharay F.** (2004). Control biológico de plagas agrícolas. CATIE. Managua. 232 pp.

**Chakraborty M. R., Chatterjee N. C.** (2008). Control of fusarium wilt of *Solanum melongena* by *Trichoderma* spp. *Biologia plantarum*, 52 (3): 582 – 586.

**Clarkson J. P., Payne T., Mead A., Whipps, J. M.** (2002): Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Plant Pathology*, 51: 735 - 745.

**Cook R. J., Baker K. F.** (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. Third printing. Ed. APS Press, St. Paul, Minnesota.

**Couteaudier Y., Louvet J., Alabouvette C.** (1987). Les problèmes pathologiques en culture hors sol. En: *Les cultures hors sol*. Second Ed. INRA Publications, Versailles. pp. 321 - 332.

**Dennis C., Webster J.** (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of British Mycological Society*, 57: 41 - 48.

**Diáñez F.** (2005). Evaluación de la capacidad supresora de la microbiótica bacteriana y fúngica del compost de orujo de vid frente a hongos fitopatógenos. Tesis Doctoral. Universidad de Almería.

- Domínguez J., Negrin M. A., Rodríguez C. M.** (2002). Aggregate water-stability, particle size and soil solution properties in conducive and suppressive soils to *Fusarium* wilt of banana from Canary island (Spain). *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 44 - 55.
- Elad Y.** (2000). *Trichoderma harzianum* (T-39). Preparation for biocontrol of plant diseases-control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology*, 10 (4): 499 - 507.
- Ellis R. J., Timms-Wilson T. M., Bailey M. J.** (2000) Identification of conserved traits in fluorescent *Pseudomonas* with antifungal activity. *Environmental Microbiology*, 2: 274 - 284.
- Esposito E., da Silva M.** (1998). Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Critical Reviews in Microbiology*, 24: 89 - 98.
- Ezziyyani M., Requena M. E., Pérez Sánchez C., Egea Gilabert C., Candela M. E.** (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) *Anales de Biología*, 26: 35 - 45.
- Fang L., Cibin G., Liu B., Jiahua C.** (2006). The inhibition effect of secondary metabolite of *Paecilomyces lilacinus* against *Fusarium oxysporum*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 33 (1): 94 – 98.
- Fang L., Huai S., Liu B., Jiahua C.** (2005). Antagonistic effect of biocontrol fungus, *Paecilomyces lilacinus* strain NH-PL-03 and its mechanism against *Fusarium oxysporum*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 32 (4): 373 – 378.
- Fargues J., Rodríguez D.** (1980). Sensibilidad des larvas de *Spodoptera littoralis* (Lep: Noctuidae) aux hiphomycetes entomophogenes, *Nomuraea rileyi* et *Paecilomyces fumosoroseus*. *Entomophtourus fungi. J. invertebr. Pathol*, 11: 70 - 81.
- Fernández-Larrea O.** (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, 62: 96 – 100.

- Galante Y. M., De Conti A., Monteverdi R.** (1998). Application of *Trichoderma* enzymes in the textile industry. En: Harman G. y Kubicek C. (eds). London: Taylor & Francis. *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. 2.
- Garret M. K., Robinson P. M.** (1969). A stable inhibitor of spore germination produced by fungi. *Archives Microbiology*, 67: 370 - 377.
- Gómez J. M.** (2004). La sanidad de los cultivos hortícolas sobre sustratos en el sur de España. En: *Tratado de cultivos sin suelo*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 523-537.
- Gomez I., Chet I., Herreraestrela A.** (1997). Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. *Mol. Gen. Genet.* 256: 127 – 135.
- Harman G., Taylor A., Stazs T.** (1989). Combinig effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant Dis.*, 73: 631 - 637.
- Hjeljord L., Tronsmo A.** (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman G. E., Kubicek C.P. (Eds). Taylor & Francis. 2: 131 - 151.
- Hopkins D. L., Larkin R. P., Elmestrom G. W.** (1987). Cultivar specific induction of soil suppressivnes to *Fusarium* wilt of watermelon. *Phytopathology*, 77: 607 - 611.
- Horn W. S., Kurtz M. B., Liesch J. M., Smith J. L., Martin I., Vicente F.** (1993). Antibiotic eicosenoic acids and their manufacture with *Paecilomyces variotii*. U.S. Patent, n° US 5233062.
- Howell C. R., Stipanovic R., Lumsden R.** (1993). Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Sci Technol*, 3: 435 - 441.
- Huang Z., Shaukat A., Shun-Xiang R., Jian-Hui W.** (2010). Effect of *Isaria fumosoroseus* on mortality and fecundity of *Bemisia tabaci* and *Plutella xylostella*. *Insect Science*, 17 (2): 140 – 148.

- Infante D., Martínez B., González N., Reyes Y.** (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Veg.* 24, 1: 14 – 21.
- Jones B.** (2000). Compendium of tomato diseases. The American Phytopathological Society. 76 pp.
- Jorgensen R. A., Cluster P. D.** (1989). Models and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 75: 1238 - 1247.
- Keel C., Défago G.** (1997). Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. En: *Multitrophic interactions interrestrial system*. GangeAC, Brown VK, eds. Oxford: Blackwell Science, pp. 27 - 47.
- Khachatourians G.G.** (1996). Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. En: Howard/Miller eds., Springer-Verlag, Berlin. *The Mycota VI. Human and Animal Relationships*, pp. 331-364
- Kilama P., Dubois T., Coyne D., Niere B., Gold C. S., Adipala E.** (2007). Antagonism of *Paecilomyces* spp. isolated from banana (*Musa* spp.) roots and rhizosphere against *Radopholus similis*. *Nematropica*, 37 (2): 215 – 225.
- Kubicek C. P., Lorito M., Farkas V., Rebuffat S., Bodo B.** (1996). Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.*, 178 (21): 6382 - 5.
- Kumar V., Misra A., Gupta A., Pandey B., Gaur R.** (2010). RAPD-PCR of *Trichoderma* isolated and in vitro antagonism against *Fusarium* wilt pathogens of *Psidium guajava*. *Journal of plant protection research*, 50 (3): 256 – 262.
- Lara-Martes J., Acosta N., Vicente N., Rodríguez R.** (1996). Control biológico de *Meloidogyne incognita* en tomate en Puerto Rico. *Nematropica*. 26 (2): 143 - 151.

- Larkin E. P., Hopkins D. L., Martin F. N.** (1993). Effect of successive watermelon plantings on *Fusarium oxysporum* and other microorganisms in soil suppressive and conducive to *Fusarium* wilt of watermelon. *Phytopathology*, 83: 1097 - 1105.
- Lewis J. A., Papavizas G. C.** (1991). Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. *Crop protection*, 10: 95 - 105.
- Lezama-Gutiérrez R., Alatorre-Rosas R., Sánchez-García F.** (1994). Evaluación de cepas de *Noumuraea rileyi* y *Paecilomyces fumosoroseus* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Internacional de Control Biológico*, México, 1 (1): 19 – 22.
- Lopes F., Steindorff A., Geraldine A., Brandão R., Monteiro V., Júnior M., Coelho A., Elhoa C., Silva R.** (2012). Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potencial antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *British Mycological Society*, 116: 815 – 824.
- López-Mondéjar R., Ros M., Pascual J. A.** (2011). Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control*, 56 (1): 59 - 66.
- Maheshwari D. K., Dubey R. C., Sharma V. K.** (2001). Biocontrol effects of *Trichoderma virens* on *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. *Indian Journal Microbiol.*, 4: 251 - 256.
- Maroto Borrego J. V., Gómez A. M., Pomares F.** (2002). El Cultivo de la Sandía. Fundación Caja Rural. 328 pp.
- Maymon M., Minz D., Barbul O., Zveibil A., Elad Y., Freeman S.** (2004). Identification of *Trichoderma* biocontrol isolates to clades according to ap-PCR and ITS sequence analyses. *Phytoparasitica*, 32 (4): 370 – 375.
- Messiaen C. M., Blancard D., Rouxe, F., Lafon R.** (1995). Enfermedades de las hortalizas. Ed. Mundi-Prensa. 3ª edición. Madrid, España. 576 p.

**Messiaen C. M., Cassini R.** (1968). Recheches Sur les fusarioses. IV. La systématique des *Fusarium*. *Ann. Épiphyt.*, 19: 387 - 464.

**Messiaen C. M., Lafon R.** (1970). Les maladies des plantes maraicheres. INRA. Paris, 441 pp.

**Michely M. R, Bova R.** (1997). Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. ISBN: 3540612297. 441 pp.

**Mondino P., Vero S.** (2006). Control biológico de patógenos de plantas. Montevideo, Universidad de Agronomía de Uruguay.

**Mullis K. B., Faloona F.** (1987). Specific Synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335 - 350.

**Muthukumar A., Eswaran A., Sanjeevkumas K.** (2011). Exploitation of *Trichoderma* strains of the growth of *Pythium aphanidermatum* in Chilli. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 1598 – 1607.

**Papavizas G.** (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review Phytopathology*, 23: 23 - 54.

**Papavizas G. C., Lumsden, R. D.** (1980). Biological control of soilborne fungal propagules. *Annual Review of Phytopathology*, 18: 389 - 413.

**Peng H. X., Sivasithamparam K., Turner D. W.** (1999). Chlamyospore germination and *Fusarium* wilt of banana plantlets in suppressive and conductive soils are affected by physical and chemical factors. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 1363 - 1374.

**Pereyra S., Garmendia G., Cabrera M., Vero S., Pianzola M. J., Dillmacky R.** (2005). Control biológico de la fusariosis de la espiga de trigo y cebada. *Agrociencia*, 9: 337 - 343.

**Pérez Bocourt Y., Cantillo T., Ramos E., González M., López M. O.** (2009). Prospección de hongos de suelo con potencialidades para el control biológico en suelos de agroecosistemas cubanos. *Fitosanidad*, Ciudad de la Habana, 13 (1).

**Poprawski T. J., Greenberg S. M., Ciomperlok M. A.** (2000). Effect of host plant on *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* induces mortality of *Trialeurodes vaporariorum*. *Environmental Entomology*, 29 (5): 83 - 96.

**Prats G.** (2005). Microbiología clínica. Editorial panamericana. 400 pp.

**Pucheta M., Flores A., Rodríguez A.N.** (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, Venezuela, 31 (12): 856 - 860.

**Putri S. P., Hiroshi K., Masayasu K., Takuya N.** (2010). Antimicrobial and antioomycete activities of the novel antibiotic farinomalein. Poster Presentation 2P-2124, Annual Conference, *The Society for Bioscience and Bioengineering*, Japan.

**Reithner B., Brunner K., Schuhmacher R., Peissl I., Seidl V., Krska R., Zeilinger S.** (2005). The G protein  $\alpha$  subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet Biol.*, 42: 749 - 760.

**Reithner B., Schuhmacher R., Stoppacher N., Pucher M., Brunner K., Zeilinger S.** (2007). Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk 1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genet Biol.*, 44: 1123 - 1133.

**Riba G., Silvy C.** (1989). Combattre les ravageurs des culture, enjeux et perspective, INRA.

**Rincón A.** (2004). Mejora de la capacidad antagonista de *Trichoderma harzianum* y de la resistencia a patógenos de *Nicotiana tabacum* mediante sobreexpresión de la  $\beta$ -1,3 glucanasa I. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.



**Rouxel F., Tivoli B., Sarniguet A., Lucas, P.** (1991). Expression d'une maladie: le sol n'est pas neutre. *Cultivar*, 300: 65 - 68.

**Saiki R. K., Gelfand D. H., Stofel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487 - 491.

**Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Santos M., Carretero F., Diáñez F., de Cara M., Marín F., Tello J. C.** (2009). Characterization of soil suppression to *Fusarium* wilt. Book of Abstracts. III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2009). Lisboa (Portugal), 155-155.

**Santos M., Diáñez F.** (2010). Los antagonistas microbianos en el manejo de micosis de la parte aérea de la planta. En: Organismos para el control de patógenos en los cultivos protegidos. Prácticas culturales para una agricultura sostenible. Ed. Fundación Cajamar. 523 - 528.

**Santos M., Diáñez F., De Cara M., Tello J. C.** (2008). Possibilities of the use of vinasses in the control of fungi phytopathogens. *Bioresourcere Tehnology*, 99: 9040 - 9043.

**Scher F. M., Baker R.** (1980). Mechanism of biological control in a *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology*, 70: 412 - 417.

**Schroth M. N., Hancock J. G.** (1981). Selected topics in biological control. *Annual Review of Microbiology*, 35: 453 - 476.

**Sharma P. D.** (2004). Plant Pathology. Rastogi publications. New delhi. 478 pp.

**Slattery M., Rajbhandari I., Wesson K.** (2001). Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. *Microbial Ecology*, 41: 90 - 96.

**Smith P.** (1993). Control of *Bemisia tabaci* and the potencial of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Biocontrol News and Information*, 14: 71N - 78N.

**Smith, S. N., Zinder, W. C.** (1971). Relationships of inoculums density and soil types to severity of *Fusarium* wilt of sweet potato. *Phytopathology*, 61: 1049 - 1051.

**Sneh B., Dupler M., Elad Y., Baker R.** (1984). Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology*, 74: 1115 - 1124.

**Sneh B., Pozniak D., Salomon D.** (1987). Soil suppressiveness to *Fusarium* wilt of melon induced by repeated croppings of resistant varieties of melons. *Journal of Phytopathology*, 120: 347 - 54.

**Sunesson A. L., Vaes W. H. J., Nilsson C. A., Blomquist G., Andersson B., Carlson R.** (1995). Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (8): 2911 – 2918.

**Sutton D. A., Fothergill A. W., Rinaldi M. G.** (1998). Guide to clinically significant fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

**Tello J. C., Lacasa A.** (1990). *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral mediterráneo de España. Fases parasitaria (Fusariosis vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria. *Boletín Sanidad Vegetal*, 19. 190 pp.

**Tello J. C., Trillas i Gay M. I., Bertrán E., Avilés M., Casanova i Fernández E.** (2003). *Trichoderma asperellum* (T-34): agente de control biológico contra la fusariosis y la rizoctoniosis. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, 152: 56 – 60.

**Tigano-Milani M. S., Honeycutt R. J., Lacey L. A., Assis R., McClelland M., Sobral W. S.** (1995). Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. *J. Invertebr. Pathol.*, 65 (3): 274 - 282.

**Toussoun T. A.** (1975). *Fusarium*-suppressive soils. Biology and Control of Soil-Borne Plant Pathogens. St. Paul. Am. *Phytopathol. Soc.* pp. 145 - 151.

**Tucker C. M.** (1931). Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. 208 p. Res. Bull. 153. Missouri Agric. Exp. Sta., Missouri, U.S.A.

**Turner D., Kovacs W., Kuhls K., Lieckfeldt E., Peter B., Arisan-atac I., Strauss J., Samuels G., Börner T., Kubicek C.** (1997). Biogeography and phenotypic variation in *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and associated *Hypocrea* species. *Mycol. Res.*, 101 (4): 449 – 459.

**Van Driesche R. G., Bellows T. S.** (1996). Biological Control. Chapman & Hall, New York. 539 pp.

**Vinale F., Flematti G., Sivasithamparam K., Lorito M., Marra R., Skelton B., Ghisalberti E. L.** (2009). Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*. 72 (11): 2032 - 2035.

**Vinale F., Ghisalberti E., Sivasithamparam K., Marra R., Ritieni A., Ferracane R., Woo S., Lorito M.** (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. En: Applied Microbiology. ISSN 0266 - 8254.

**Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E., Marra R., Woo S., Lorito M.** (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol Biochem.*, 40: 1 - 10.

**Walker J. M., Rapley R.** (2008). Molecular biomethods handbook. Humana Press. 1124 pp.

**Wei C., Hansen B. T., Vaughan M. H., McLaughlin, C. S.** (1974). Mechanism of action of the micotoxin Trichodermin, a 12,13-Epoxytrichothecene. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71 (3): 713 - 717.

**Weller D. M., Raaijmakers J. M., Mecsapadden Gardener B. B., Thomashow L. S.** (2002). Microbial population responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 309 - 348.

- Wendling R.** (1934). Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other fungi. *Phytopathology*, 24: 1153 - 1179.
- Whipps J. M.** (1997). Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research*, 26: 1 - 134.
- Whipps J. M.** (2000). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487 - 511.
- Wilson C. L., Wisniewski M. E., eds.** (1994). Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables: theory and practice. Boca Raton, CRC Press.
- Windham M., Elad Y., Baker R.** (1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 76: 518 - 521.
- Woese C. R., Olsen G. J.** (1986). Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the kingdoms. *Syst. Appl. Microbiol.* 7: 161 - 177.
- Wright M. S., Connick W. J., Jackson M. A.** (2003). Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites. U.S. Patent 20030095951.
- Yedidia I., Shores H., Kerem Z., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I.** (2003). Cocomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* lachrymans in cucumber by *Trichoderma aspergillum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 7343 - 7353.