

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

“BIOCONTROL DEL HONGO
ENDÓFITO CDG-17 SOBRE HONGOS
CAUSANTES DE PODREDUMBRES”

Mención: Hortofruticultura y jardinería

Modalidad: Trabajo técnico-experimental

Curso 2020/2021

Alumno/a: Ana María Yélamos León

Director/es:

Fernando José Diánez Martínez

Alejandro Moreno Gavira

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA



TRABAJO FIN DE GRADO

**Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos
causantes de podredumbres**

Alumno: *Ana María Yélamos León*

Director: *Fernando José Diánez Martínez*

Co/director: *Alejandro Moreno Gavira*

Almería, julio 2021

AGRADECIMIENTOS

No me creo que este momento haya llegado, donde realizar un Trabajo Fin de Grado lo veía como algo lejano, y al fin se muestra que uno de mis objetivos más importantes culmina con esfuerzo y constancia.

Quiero dar las gracias a Mila y Fernando que, pese a las circunstancias dadas este año, me han dado la oportunidad de realizar este proyecto en el que he adquirido conocimientos y me ha mantenido motivada. Y como no, también dar las gracias a Álex, por haber estado siempre que lo hemos necesitado.

Mención especial a mis compañeras Cristina A. y María A., por estar acompañándome durante este proyecto. Con ellas la palabra compañerismo se queda corta.

Finalmente, dar las gracias a mi pilar fundamental como son mis padres, mi hermano, y toda mi familia. Por el apoyo desde el primer día, la confianza depositada en mí, por la motivación, la capacidad de aguantar mis altibajos y agobios en estos años, reconozco que no ha sido nada fácil.

Estoy enormemente agradecida.

A todos y cada uno, gracias.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. MEMORIA DESCRIPTIVA DEL TRABAJO TÉCNICO	3
1.1 Importancia del control biológico en el sector agrario	3
1.2 Interés del tema y objetivos del proyecto	3
1.2.1 Interés del tema	3
1.2.2 Objetivos del proyecto	4
1.3 Fases de realización y cronograma	5
1.4 Revisión bibliográfica	7
1.4.1 Hongos Endófitos Septados Oscuros (DSE)	7
1.4.2 Importancia de los hongos oomicetos	8
1.4.3 Mecanismos de antagonismo	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1 Materiales	22
2.1.1 Material fúngico	22
2.1.2 Material vegetal	24
2.1.3 Material de laboratorio	24
2.2 Localización del ensayo	27
2.3 Diseño experimental	28
2.3.1 Ensayo <i>in vitro</i>	28
2.3.2 Realización del ensayo <i>in vivo</i> :	39
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1 Resultados y discusión ensayo <i>in vitro</i>	46
3.1.1 <i>Phytophthora infestans</i>	46
3.1.2 <i>Phytophthora capsici</i>	54
3.1.3 <i>Phytophthora parasitica</i>	60
3.2 Resultados y discusión ensayo <i>in vivo</i>	68
3.2.1 Resultados ensayo <i>in vivo</i>	68
3.2.2 Discusión ensayo <i>in vivo</i>	69
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES TÉCNICAS	71
5. COMPETENCIAS INTEGRADAS EN EL PROYECTO	73
6. Bibliografía y webgrafía	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cronograma de actividades para el desarrollo del proyecto.....	6
Figura 2. Relaciones filogenéticas entre los cinco reinos eucariotas Fuente: Alor (2015).....	9
Figura 3. A- Non-papillate, B-Semi-papillate, C-Papillate sporangia. Fuente: Erwin & Ribeiro (1996).....	11
Figura 4. Árbol filogenético de Phytophthora. Fuente: Blair et al., (2008).....	11
Figura 5. Tizón del pimiento provoca marchitez y decadencia de los frutos y raíces. Fuente: Koppert (2021).....	14
Figura 6. Síntomas en hoja de P.infestans Fuente: Ephytia (2021).....	16
Figura 7. Síntomas en el tallo de P. infestans. Fuente: Henfling (1987).....	16
Figura 8. Manifiesto de P. infestans en tubérculo. Se puede apreciar una coloración rojiza y una podredumbre blanda. Fuente: Fry (2008).....	17
Figura 9. CDG-17.....	22
Figura 10. Phytophthora infestans.....	22
Figura 11. Phytophthora parasítica.....	23
Figura 12. Botrytis cinerea.....	23
Figura 13. Phytophthora capsici.....	23
Figura 14. Semillas de pepino. Fuente: Cornet (2021).....	24
Figura 15. Instrumentos empleados en el ensayo. A-Pulverizador, B-Autoclave, C-Peso, D-Estufas.....	25
Figura 16. Potato Dextrose Broth.....	26
Figura 17. Agar.....	26
Figura 18. Materiales empleados en el ensayo.....	27
Figura 19. Vista aérea de la Escuela Superior de Ingeniería en la Universidad de Almería. Fuente: Google maps (2021).....	27
Figura 20. Pequeño invernadero para el ensayo in vivo.....	27
Figura 21. Etiquetado de placas.....	30
Figura 22. Marca del punto en la placa control a 1 cm del extremo.....	30
Figura 23. Marca de los dos puntos en la placa antagonista.....	31

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Figura 24. Pesando las cantidades necesarias para la realización del medio de cultivo.....	32
Figura 25. Botellas con la preparación del medio.....	32
Figura 26. Introducción del medio en autoclave.....	33
Figura 27. Vertido del medio en las placas de Petri.....	34
Figura 28. Enfriamiento de las placas.....	34
Figura 29. Medio adecuado para la siembra para evitar contaminación.....	34
Figura 30. Introducción de bandejas en estufa.....	35
Figura 31. Estufas a las distintas temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C.....	35
Figura 32. Inoculación de los fitopatógenos en placas control y antagonistas.....	36
Figura 33. Sellado de las placas con parafilm	37
Figura 34. Medición del crecimiento.....	38
Figura 35. Distribución en bandejas de los tratamientos ensayo in vivo.....	40
Figura 36. Aplicación de CDG-17 en el sustrato	41
Figura 37. Introducción del disco de micelio de <i>Botrytis</i> en el corte del tallo	42
Figura 38. Corte en el tallo de la planta de pepino	42
Figura 39. Pulverización foliar	43
Figura 40. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de <i>Phytophthora infestans</i> en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 20°C.....	47
Figura 41. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de <i>Phytophthora infestans</i> en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina sometido a una temperatura de 25°C	48
Figura 42. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de <i>Phytophthora infestans</i> en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 30°C	48
Figura 43. Representación de inhibición de crecimiento de <i>P. infestans</i> frente a CDG 17 a distintas concentraciones de sal	49
Figura 44. Antagonismo de CDG-17 y <i>P. infestans</i> a 20°C con una concentración de sal 0 g/L	50
Figura 45. Antagonismo de CDG-17 y <i>P. infestans</i> a 20°C con una concentración de sal 1 g/L	50
Figura 46. Antagonismo de CDG-17 y <i>P. infestans</i> a 30°C con una concentración de sal 2 g/L	50

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Figura 47. Antagonismo de CDG-17 y <i>P. infestans</i> con una concentración de 20 g/L a las temperaturas de A: 20°C, B: 25°C y C: 30°C.....	51
Figura 48. Representación gráfica de los valores de inhibición de crecimiento del patógeno <i>P. infestans</i> frente a CDG-17 a distintas temperaturas.....	51
Figura 49. Placas de antagonismo <i>P. infestans</i> frente a CDG-17 a diferentes concentraciones y temperatura	53
Figura 50. Representación unifactorial ensayo antagonismo <i>P. infestans</i> y CDG17.....	53
Figura 51. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de <i>Phytophthora capsici</i> en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 20°C	54
Figura 52. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de <i>Phytophthora capsici</i> en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 25°C	55
Figura 53. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de <i>Phytophthora capsici</i> en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 30°C	56
Figura 54. Representación de inhibición de crecimiento de <i>P. capsici</i> frente a CDG 17 a distintas concentraciones de sal	57
Figura 55. Antagonismos de <i>P. capsici</i> frente a CDG-17 a diferentes concentraciones. A: 10g/L. B: 20 g/L. C: 15 g/L.....	57
Figura 56. Representación gráfica de los valores de inhibición de crecimiento del patógeno <i>P. capsici</i> frente a CDG-17 a distintas temperaturas.....	58
Figura 57. Antagonismo <i>P. capsici</i> a 30°C.....	58
Figura 58. Antagonismo <i>P. capsici</i> a 25°C	58
Figura 59. Representación unifactorial ensayo antagonismo <i>P.capsici</i> y CDG17.....	59
Figura 60. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de <i>Phytophthora parasitica</i> en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 20°C.....	61
Figura 61. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de <i>Phytophthora parasitica</i> en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 25°C.....	62
Figura 62. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de <i>Phytophthora parasitica</i> en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 30°C	63
Figura 63. Representación de inhibición de crecimiento de <i>P. parasitica</i> frente a CDG 17 a distintas concentraciones de sal.....	64
Figura 64. Antagonismo <i>P. parasitica</i> frente a CDG-17 a una concentración de 1 g/L.....	65

Figura 65. Antagonismo <i>P. parasitica</i> frente a CDG-17 a una concentración de 5 g/L.....	65
Figura 66. Antagonismo <i>P. parasitica</i> frente a CDG-17 a una concentración de 20 g/L.....	65
Figura 67. Representación gráfica de los valores de inhibición de crecimiento del patógeno <i>P. parasitica</i> frente a CDG-17 a distintas temperaturas.....	66
Figura 68. Representación de la severidad de <i>Botrytis cinerea</i> en plántulas de pepino.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Phytophthora en seis grupos por Waterhouse (1963). Fuente: Drenth, & Sendall, (2001)	10
Tabla 2. Distribución de placas de Petri en el ensayo con el patógeno <i>P. parasitica</i>	28
Tabla 3. Distribución de placas de Petri en el ensayo con el patógeno <i>P. capsici</i>	29
Tabla 4. Distribución de placas de Petri en el ensayo con el patógeno <i>P. infestans</i>	29
Tabla 5. Tratamientos ensayo in vivo.....	39
Tabla 6. Escala de valoración	43

RESUMEN

El uso de plaguicidas en la agricultura está generando un gran impacto tanto a nivel medioambiental, resultando ser tóxico y perjudicial (Hashmi et al., 2019; Kafaei et al., 2020). Es por ello, por lo que la agricultura se orienta hacia la reducción de plaguicidas químicos y la introducción de sistemas sostenibles con el uso de agentes de manejo biológico.

El campo del control biológico en la agricultura presenta un gran interés como medida alternativa para controlar diferentes patógenos vegetales, así como plagas, contribuyendo a generar un sistema de producción de alimentos más respetuoso con el medio ambiente y con la salud humana (Ab Rahman et al., 2018; Haas & Défago, 2005).

La alternativa de usar hongos y bacterias endofíticas para el manejo de diferentes patógenos que afectan a los cultivos puede ser una opción biológica muy importante hoy en día, se da una amplia gama de efectos beneficiosos para las plantas a partir de formulaciones, las cuales contienen mezclas de distintas especies (Khan & Mohiddin, 2018).

Palabras clave: control biológico, patógenos vegetales, hongos endófitos.

ABSTRACT

The use of pesticides in agriculture is generating a great impact both at an environmental level, turning out to be toxic and harmful (Hashmi et al., 2019; Kafaei et al., 2020). That is why agriculture is oriented towards the reduction of chemical pesticides and the introduction of sustainable systems with the use of biological management agents.

The field of biological control in agriculture is of great interest as an alternative measure to control different plant pathogens as well as pests, helping to generate a food production system that is more respectful of the environment and human health (Ab Rahman et al., 2018; Haas & Défago, 2005).

The alternative of using endophytic fungi and bacteria for the management of different pathogens that affect crops can be a very important biological option today, it gives a wide range of beneficial effects for plants from formulations, which contain mixtures of different species (Khan & Mohiddin, 2018).

Keywords: biological control, plant pathogens, endophytic fungi

1. Memoria descriptiva del trabajo técnico



1. MEMORIA DESCRIPTIVA DEL TRABAJO TÉCNICO

1.1 Importancia del control biológico en el sector agrario

El sector agrario supone un papel fundamental en nuestra vida cotidiana, además de ser un sector primario en el contexto de la economía, es indispensable para el sostenimiento de los pueblos, tratándose de una actividad suministradora de productos de primera necesidad (Cerdá, 2003). Desde entonces, la agricultura no deja de innovar tanto científicamente como tecnológicamente para obtener unos mejores rendimientos de los cultivos, dando gran importancia a la calidad y asegurando la protección de las plantas contra plagas y enfermedades, ya que esto podría suponer la pérdida total de la producción (Martínez, 2008).

Para obtener un aumento en el rendimiento de los cultivos y a la vez protegerlos contra plagas y patógenos, se optó en un principio por hacer un uso extensivo de agroquímicos, uno de los componentes principales del Manejo Integrado de Plagas (MIP). Es cierto que el uso de plaguicidas ha resultado ser eficaz en la mejora de la calidad de los cultivos y en el aumento de la producción agrícola (Ragsdale et al., 1991); sin embargo, con el paso del tiempo se ha demostrado que esta aplicación no era correcta, tenía efectos secundarios como la contaminación de los alimentos, repercusión ambiental, además de tener un alto coste (Carvalho, 2006). Otro punto en contra de la utilización de agroquímicos es la destrucción de microbios beneficiosos, como hongos endofíticos beneficiosos, bacterias e insectos (Berg, 2009). Es el caso de productos como triclopir, un herbicida que inhibe las bacterias beneficiosas que oxidan el amoníaco, y flifosato (Pell et al., 1998; Santos & Flores, 1995).

Así nació entonces la importancia que se le da hoy en día al control biológico para el control de enfermedades fúngicas, cuyo objetivo es reducir el uso excesivo y dependencia de agroquímicos y los riesgos que conlleva (Cook & Baker, 1983). El control biológico se prevé que continúe desempeñando un papel importante en la agricultura moderna tanto en el presente como en el futuro.

1.2 Interés del tema y objetivos del proyecto

1.2.1 Interés del tema

En la actualidad, el uso de plaguicidas en la agricultura está generando un gran impacto tanto a nivel medioambiental, por su larga duración y degradación en el medioambiente, como en la salud del ser humano, resultando ser tóxico y perjudicial para este (Hashmi et al., 2019; Kafaei et al., 2020). Es por ello, por lo que la agricultura se orienta cada vez más hacia la reducción de plaguicidas químicos y la introducción de sistemas sostenibles con el uso de agentes de manejo biológico. El campo del control

biológico en la agricultura presenta un gran interés como medida alternativa para controlar diferentes patógenos vegetales, así como plagas, contribuyendo a generar un sistema de producción de alimentos más respetuoso con el medio ambiente y con la salud humana (Ab Rahman et al.,2018; Haas & Défago, 2005). Dentro del control biológico, hay varias opciones disponibles; sin embargo, es necesario profundizar en el estudio para comprender la compleja interacción entre las plantas, el medio ambiente y patógenos (Mirzaee et al., 2015).

La necesidad de reducir la utilización de fertilizantes químicos, así como productos fitosanitarios de síntesis, ha dado paso a la práctica de la inoculación, por lo que el uso de inóculos microbianos está teniendo especialmente interés debido a la demanda impuesta por la sostenibilidad ambiental (Ezziyani et al.,2006). La alternativa de usar hongos y bacterias para el manejo de diferentes patógenos que afectan a los cultivos puede ser una opción biológica muy importante hoy en día, se da una amplia gama de efectos beneficiosos para las plantas a partir de formulaciones, las cuales contienen mezclas de distintas especies. Son varios estudios los que han plasmado los beneficios que tienen los hongos, en concreto *Trichoderma*, para el crecimiento de las plantas incrementando el rendimiento de la producción (Khan & Mohiddin, 2018).

En este proyecto se pretende evaluar la capacidad de un hongo endófito septado oscuro (DSE) como agente de control biológico de diferentes patógenos que afectan a los cultivos.

Los endófitos septados oscuros son un grupo de hongos del suelo que colonizan las ubicaciones inter y/o intracelulares de las plantas, estableciendo un gran abanico de interacciones simbióticas con las plantas que las albergan, no dañando visiblemente las plantas hospedadoras (Hallmann et al., 1997; Mandyam & Jumpponen, 2005).

1.2.2 Objetivos del proyecto

Una vez vista la importancia del control biológico, el objetivo general del desarrollo de este proyecto fue el estudio del hongo endófito DSE CDG-17, como agente potencial de control biológico. Para ello, los objetivos específicos son:

- Determinar la influencia de las condiciones bajo las cuales el DSE disminuye su crecimiento y su efectividad frente a fitopatógenos oomicetos con diferentes condiciones de temperatura y salinidad en el ensayo *in vitro*.

Para ello, fue preciso determinar:

- La capacidad antagonista de CDG-17 sobre distintos patógenos oomicetos mediante la técnica dual en placa de Petri bajo distintas condiciones de temperatura y salinidad con diferentes concentraciones de cloruro sódico.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

- Los parámetros establecidos para evaluar el ensayo son: las distintas salinidades del medio de cultivo que serán de $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y las temperaturas concretas de 20°C , 25°C y 30°C . Se realizarán cinco repeticiones para cada tratamiento. Se mide el crecimiento de las muestras a diario para que posteriormente tras un análisis de datos se pueda determinar si existe inhibición del crecimiento del patógeno causado por el DSE. Los patógenos analizados serán *Phytophthora capsici*, *P. parasitica* y *P. infestans*.
- Determinar la efectividad como agente de control biológico del DSE CDG17 frente a *Botrytis cinerea* en un ensayo *in vivo* con plántulas de pepino.

El ensayo *in vivo* se realizará mediante la inoculación natural de *Botrytis cinerea* en plántulas de pepino. CDG17 será aplicado en el sustrato, y se medirá la cantidad de enfermedad mediante una escala de 0 a 4, donde 0 es planta sana y 4, 100% de hojas afectadas por podredumbre gris.

- *Statgraphics*, para la realización del análisis estadístico. Para todos los datos obtenidos se realizará el test de normalidad según el criterio de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov (Chakravart et al., 1967) y la evaluación de homocedasticidad de varianzas según Test de Levene (Levene, 1960) sobre los datos. En primer lugar, se realizará un análisis de la varianza ANOVA factorial, para proseguir con un ANOVA y separación de medias mediante el método LSD de Fisher ($p \leq 0,05$) (Fisher, 1925). Se utilizará el paquete estadístico *Statgraphics Centurion XV*.

1.3 Fases de realización y cronograma

Para tener una visualización más clara sobre las distintas fases/actividades que se han llevado a cabo en el seguimiento del desarrollo del proyecto se ha realizado el siguiente diagrama:

1.4 Revisión bibliográfica

1.4.1 Hongos Endófitos Septados Oscuros (DSE)

Los registros fósiles de endófitos microbianos se remontan a más de 400 millones de años (Remy et al., 1994).

La definición más completa de endófitos fúngicos es la que describe Hallman et al., (1998). “Se definen como microorganismos que pueden aislarse de los tejidos vegetales desinfectados en la superficie o extraerse del interior de las plantas, no dañando a las plantas hospedantes”. Además, pueden desempeñar múltiples funciones beneficiosas como defiende Yuan et al., (2017), dando lugar a la mejora en el crecimiento de las plantas regulando las fitohormonas, además de brindar una mejor tolerancia al estrés del huésped. Se caracterizan por poseer una pigmentación oscura intensa y formación de hifas septadas, ocasionalmente microesclerocios. Pueden estar presentes en varios ambientes, incluso en condiciones de sequía, en presencia de metales pesados y en suelos oligotróficos (Mandyam, & Jumpponen, 2005). Estos se asocian con la mayoría de las especies de plantas que se encuentran en los ecosistemas naturales y gestionados.

Uno de los grupos más estudiados dentro del grupo de endófitos son los septados oscuros (DSE). Los endófitos septados oscuros (DSE) comprenden un grupo misceláneo de hongos anamórficos ascomicetos que se caracterizan por formar estructuras melanizadas como hifas y microesclerocios en la raíz intracelular e intercelular de las plantas (Jumpponen, 2001). La gran mayoría pertenecen a algunas órdenes del filo *Ascomycota* (Jumpponen & Trappe, 1998), aunque también a *Basidiomycota*, *Oomycota* y *Zygomycota* (Rundfeldt, 2011).

Según varios estudios, los endófitos son capaces de regular las actividades fisiológicas de las plantas hospedantes y de producir nuevos compuestos bioactivos naturales. Una de las causas principales por las que se utilizan este tipo de hongos en la agricultura es por la alta resistencia que presentan en las plantas hospedantes contra enfermedades, estrés abiótico, nematodos e insectos (Sornakili et al., 2020).

Hoy en día, la información acerca de la diversidad y función de los hongos endófitos experimentados en diferentes condiciones es algo limitada debido a que se basa en un círculo pequeño de condiciones experimentales, por ello, el objetivo de este proyecto es profundizar en la investigación sobre el funcionamiento de los hongos endófitos frente a otros patógenos y ver la interacción planta-endófito.

1.4.2 Importancia de los hongos oomicetos

La aparición de enfermedades en las distintas plantaciones o especies de cultivo en la agricultura es uno de los principales factores que provocan una severa repercusión en la pérdida económica, en la biodiversidad de las especies silvestres, seguridad alimentaria y en el medio ambiente. De ahí que el grupo más importante de agentes que causan enfermedades por su capacidad de infectar sean los hongos y oomicetos fitopatógenos, por ello, para el control de las enfermedades originadas por estos organismos, es fundamental entender y conocer la evolución y mecanismos de virulencia asociados para desarrollar estrategias sostenibles (Fisher et al., 2012; Philips et al., 2008).

Los oomicetos incluyen cuatro órdenes, dos de las cuales contienen patógenos vegetales muy importantes, *Saprolegniales* y *Peronosporales*. Dentro de los *Peronosporales*, la familia *Pythiaceae* contiene varios géneros, siendo los más conocidos y destacados *Phytophthora* y *Pythium* (Van der Plaats-Niterink, 1981).

Los oomicetos son un grupo diverso de protistas filamentosos que se asemejan a los hongos morfológicamente, conocidos también como “mohos de agua”. Han desarrollado estilos de vida saprofitos o patógenos. Son miembros pertenecientes al reino Chromista ya que varias especies crecen a través de hifas filamentosas (Kamoun, 2003); aunque tras varios estudios puede decirse que los oomicetos tienen una limitada afinidad taxonómica con los hongos filamentosos, pareciendo estar más cercanamente relacionados con las algas pardas por presentar meiosis en los gametangios, clasificándose dentro del grupo *Stramenopiles*, uno de los principales reinos eucariotas (Baldauf et al., 2000).

Una de las características que diferencian a los oomicetos es la posesión de flagelos en las zoosporas que a su vez son producidas en esporangios. Estas zoosporas se encuentran sumergidas en películas de agua en la superficie de las hojas, en medios hidropónicos, en agua en el suelo y en cuerpos naturales de agua (Fry et al., 2010).

Este grupo de cientos de organismos, incluyen algunos de los patógenos más destructores dando lugar a enfermedades como tizón de plántulas, damping-off, pudrición de raíces, tizones foliares y mildius vellosos (Fry et al., 2010).

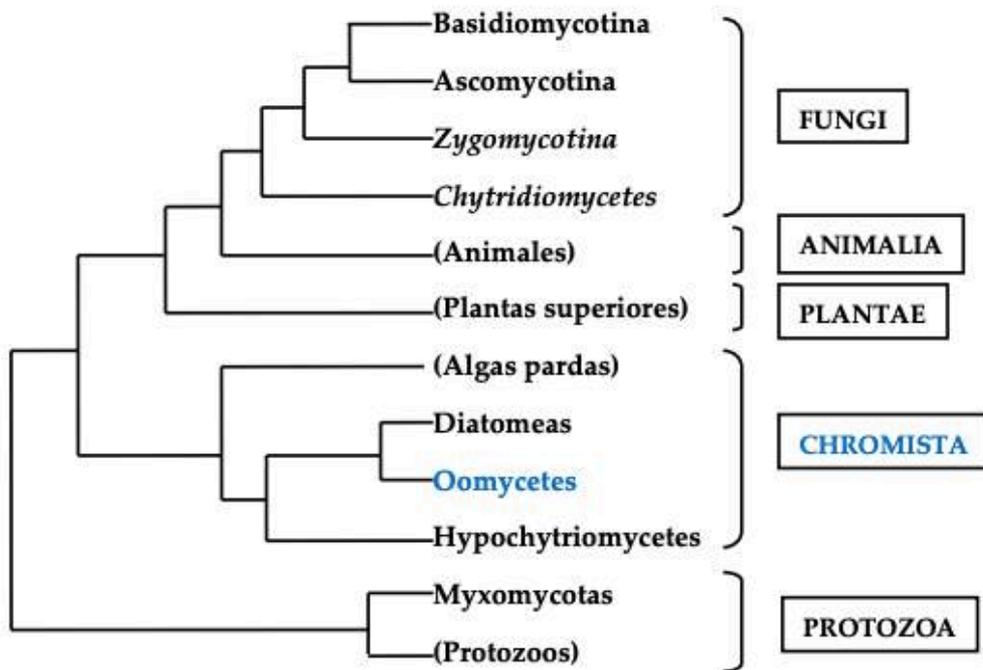


Figura 2. Relaciones filogenéticas entre los cinco reinos eucariotas. Fuente: Alor (2015)

En este presente proyecto, se ha hecho énfasis en especies del género *Phytophthora*.

1.4.2.1 GÉNERO *PHYTOPHTHORA*

El nombre de *Phytophthora* proviene del griego *phytón* que significa "planta" y *-phthora*, "destrucción"; traducido literalmente como "destructor de plantas". Este nombre fue impuesto por Heinrich Anton de Bary en el siglo XIX cuando investigó la enfermedad de la papa en la Gran Hambruna Irlandesa (Kroon et al., 2012).

Se trata de un género de patógenos vegetales *Oomycetes* que contiene aproximadamente 100 especies, de las cuales 60 son reconocidas oficialmente (Erwin & Ribeiro, 1996), perteneciente al orden *Peronosporales*, dentro de la clase *Oomycetes* en el Reino Chromista (Hawksworth et al., 1996). La mayoría son invasores primarios de tejido vegetal con capacidad saprotrófica limitada, causando de manera general, enfermedades con gran repercusión en la agricultura en el mundo, como es el caso del tizón tardío de la papa en la hambruna irlandesa causada por *P. infestans* en 1840 y la pudrición radicular del pimiento (*Capsicum annuurn*) por *P. capsici*, las cuales han supuesto grandes pérdidas significativas. Dichas enfermedades se manifiestan con la pudrición de raíces, cuello de la planta, canchros del tallo, tizón de las hojas y pudrición de la fruta. Además, otras causan gomosis y enfermedades de la tinta atacando al tronco y raíces de ciertos árboles (Biçiçi, & Cinar, 1990). Los patógenos *Phytophthora* prosperan

en condiciones húmedas, mojadas y con temperaturas entre 13°C-24°C, lo que dificulta su control (Ocampo, 2003; Bary, 1876).

1.4.2.1.1 Taxonomía

En la última década, el número de especies de *Phytophthora* se ha duplicado, debido al alcance de herramientas más específicas que disponemos en la actualidad para su determinación, además de información más actualizada (Kroon et al., 2012).

Para poder identificar y clasificar especies dentro de este género se utilizó una clave que desarrolló Waterhouse, basándose principalmente en la papilación y caducidad de los esporangios, el sistema de apareamiento y el tipo de unión anteridial, la cual fue posteriormente modificada por Sellos y col. (Waterhouse, 1963; Stamps et al., 1990).

Al principio, el género se divide en seis grupos por Waterhouse (tabla 1) teniendo en cuenta los dos tipos de anteridios y los tres tipos de esporangios. Adicionalmente, se tuvieron en cuenta criterios tanto morfológicos como fisiológicos para distinguir las especies como pueden ser la relación entre temperatura-crecimiento, rango de hospedadores, clamidosporas, morfología de colonias e hifas; sin embargo, esta clave de Waterhouse no era del todo manejable, investigadores encontraban incompatibilidades dentro de una misma especie (Kroon et al., 2012). Posteriormente, para caracterizar los aislados de *Phytophthora*, se utilizaron métodos basados en ADN, marcadores de AFLP y microsatélites (Flier et al., 2007; Flier et al., 2003).

Tabla 1. Clasificación de *Phytophthora* en seis grupos por Waterhouse (1963). Fuente: Drenth, & Sendall, (2001)

Grupo	Esporangio	Anteridio	Ejemplos
I	Papillate	Paragynous	<i>P.cactorum</i>
II	Papillate	Amphigynous	<i>P.capsici</i>
III	Semi- papillate	Paragynous	<i>P.inflata</i>
IV	Semi- papillate	Amphigynous	<i>P.infestans</i>
V	Non-papillate	Paragynous	<i>P.sojae</i>
VI	Non-papillate	Amphigynous	<i>P.cinnamomi</i>

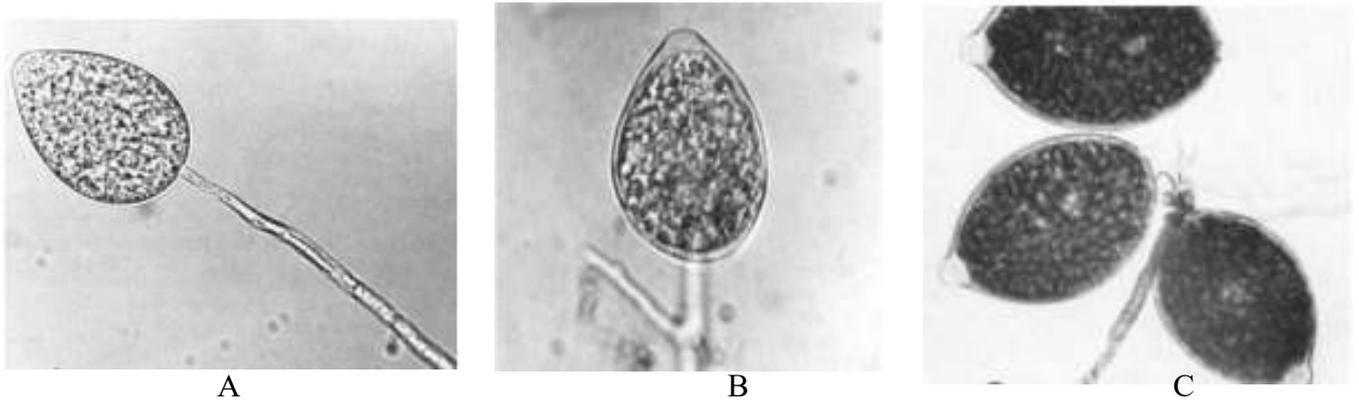


Figura 3. A-Non-papillate, B-Semi-papillate, C-Papillate sporangia. Fuente: Erwin & Ribeiro (1996)

Según Kroon et al. (2012), 116 especies de *Phytophthora* se agrupan en 10 clados dentro del género, los cuales consisten en agrupar a un único ancestro común y sus descendientes. En este caso, centrándonos en las especies elegidas, *P. infestans* pertenece al clado 1, *P. capsici* al 2 y *P. parasitica* se clasifica en el clado 1 sin pertenecer a ningún subclado.

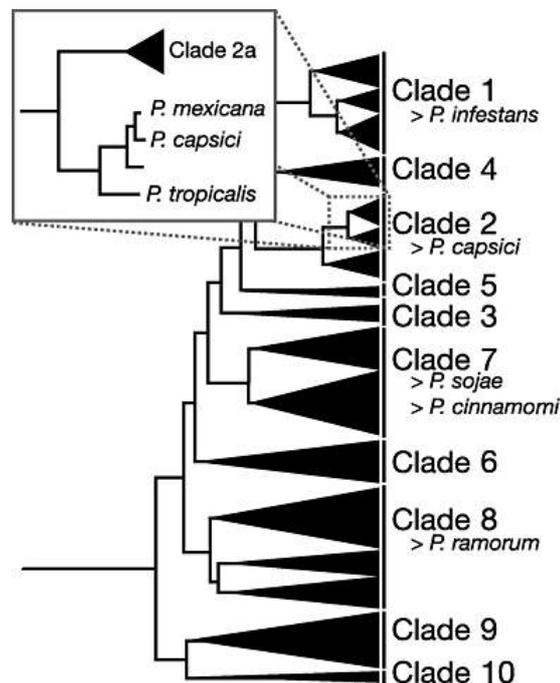


Figura 4. Árbol filogenético de *Phytophthora*. Fuente: Blair et al.,(2008)

1.4.2.1.2 Morfología

Las especies de dicho género poseen un **micelio** que circula entre las células y emite unos espolones denominados haustorios hacia las células para alimentarse, es decir, chupan los nutrientes de las células de la planta, por lo que como consecuencia se produce la muerte de la planta mientras el hongo continúa creciendo, produciendo nuevos esporangóforos (Aristizábal & Torres, 2015; Ramírez et. al, 1998). El micelio está constituido por hifas.

1.4.2.1.3 Reproducción

Las especies del género *Phytophthora* pueden reproducirse de manera asexual o sexual, desarrollándose de forma diferente en función de las condiciones ambientales.

- Asexual

En este tipo de reproducción se da la formación de esporangios y clamidosporas, que contienen las zoosporas.

El crecimiento ligado a la reproducción asexual y al desarrollo del micelio tiene lugar su desarrollo durante casi todo el ciclo del cultivo.

Por otro lado, en esta fase, cuando la humedad es baja los conidios germinan rápidamente. En caso contrario, cuando la humedad es alta, los conidios germinan a esporangios para dar lugar a zoosporas.

- Sexual

Esta fase de reproducción sexual se desarrolla al final del ciclo del cultivo o en condiciones desfavorables. Se caracteriza por la producción de gametangios: oogonios y anteridios. Además, el núcleo vegetativo es diploide, ya que la meiosis no ocurre hasta la formación de los gametangios (Fry et al., 2010).

Según Erwin y Ribeiro (1996), las especies de *Phytophthora* se pueden clasificar en dos grupos atendiendo a la sexualidad, caracterizadas por la formación de oosporas, en:

-Homotáticas. A este grupo pertenece casi la mitad de las 60 especies reconocidas en este género. Se trata de especies autofértiles, pudiendo completar la etapa sexual y formar oosporas un solo aislado.

-Heterotáticas. Las especies restantes, incluidas *P. capsici* y *P. infestans*, son heterotáticas, por lo que están constituidas por individuos autoestériles y se requiere la unión de gametos compatibles; es decir, es imprescindible la presencia de dos tipos de

apareamiento: A1 y A2. Uno actúa como gameto masculino y el otro como femenino para poder reproducirse sexualmente. Cada tipo de apareamiento es bisexual, capaz de producir anteridios y oogonios a partir de la diferenciación de su micelio vegetativo. Como consecuencia de la fusión genética, cuando ambos apareamientos están presentes, se obtiene la formación de oosporas por la unión de anteridio y oogonio. Es importante aclarar, como hicieron Galindo y Gallegly (1960) que, a ambos tipos de apareamiento no se le consideran como formas sexuales sino como grupos de compatibilidad, ya que anteridio u oogonio de un tipo puede aparearse con el oogonio o anteridio del tipo opuesto.

1.4.2.2 Especies de *Phytophthora* utilizadas en el estudio

1.4.2.2.1 *Phytophthora capsici*

Taxonomía:

Reino: Chromista

Clase: *Oomycetes*

Orden: Peronosporales

Familia: Peronosporaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora capsici*

Patógeno que afecta principalmente a variedades de pimiento (figura 5), enfermedad denominada “tizón del pimiento” y en general, a todas las cucurbitáceas, como pepino, melón, calabaza, también en algunas solanáceas como tomate y berenjena, incluso se le ha encontrado atacando cultivos de habas (*Vicia faba*) y habichuelas (*Phaseolus lunatus*), plantas que no eran hospedantes viables de este patógeno (Shea et al., 1980).

Es uno de los oomicetos que más influencia tiene respecto a la infección causada debido a la disposición de una amplia gama de huéspedes, con una gran diversidad genotípica, produciendo esporas sexuales latentes de larga vida además de tener un ciclo explosivo de enfermedades asexuales (Lamour et al, 2012).

Así, es uno de los patógenos más perjudicial, causando enfermedades principalmente en pimiento en todo el mundo, haciendo mención especial a la zona mediterránea (Palazón y Palazón, 1989; Molina et al., 2010).

Da lugar a la pudrición radicular y del cuello de plantas de cualquier edad (Ocampo, 2003). Según Leonian (1922), *P. capsici* se describió por primera vez después

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

se su repercusión en la estación de investigación Agrícola en el Nuevo México en Las Cruces en 1918.

P. Capsici se clasifica en el Clade 2 de los 10 clados principales en los que se clasifican las especies de *Phytophthora*, estando estrechamente ligada a *P. tropicalis* (Aragaki & Uchida, 2001), como puede observarse en la figura 4.

Se trata de una especie heterotálica, por lo que son necesarios ambos tipos de apareamiento (A1 y A2) para la reproducción sexual (Erwin & Ribeiro, 1996). En Estados Unidos se ha demostrado ser la única especie heterotálica de *Phytophthora* que logra completar regularmente la etapa sexual (cruzamiento) (Lamour et al., 2012).

En cuanto a la temperatura necesaria para su crecimiento, *P. capsici* requiere un mínimo de 10°C, apareciendo en ambientes donde la temperatura está entre 15-33°C y el suelo húmedo, siendo su temperatura óptima 28°C (Erwin & Ribeiro, 1996).



Figura 5. Tizón del pimiento provoca marchitez y decadencia de los frutos y raíces. Fuente: Koppert (2021)

1.4.2.2.2 *Phytophthora parasitica*

Taxonomía:

Reino: Chromista

Clase: Oomycetes

Orden: Peronosporales

Familia: Peronosporaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora parasitica*

Waterhouse y Waterston (1964) distinguen dos variedades: *P. nicotianae* var. *nicotianae* y *P. nicotianae* var. *parasitica*. Esta separación no es defendida por Erwin y Ribeiro (1996), quienes consideran a *P. parasitica* como sinónimo de *P. nicotianae*. A lo largo del texto, se utilizará el nombre de *P. parasitica* para referirnos a esta especie de *Phytophthora*.

Se clasifica en el clado 1 del género *Phytophthora*. Esta especie posee características específicas que la diferencian del resto, como la posesión de hifas hialinas y aseptadas, con hinchazones hifales ocasionalmente (Ko,1981).

Los esporangios que produce son de forma más redondeada que el resto de las especies *Phytophthora*, no siendo caducos.

Haciendo referencia a la defensa de Marin et al., (2014) en su artículo, en España, *P. parasitica* da lugar a la pudrición de raíz y corona en pimiento, en concreto, en Toledo y Ciudad Real (Bartual et al., 1991). Este patógeno se encuentra asociado ocasionalmente con *P. capsici* como se ha podido observar en las regiones de Andalucía (Larregla, 2003) y Galicia (Pomar et al., 2001).

1.4.2.2.3 *Phytophthora infestans*

Reino: Chromista

Clase: *Oomycetes*

Orden: Peronosporales

Familia: Peronosporaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *Phytophthora infestans*

Se trata de un protista que infecta y se reproduce en la parte aérea del hospedante sexual o asexualmente, perteneciente a la clase *Oomycetes*. Es el patógeno más relevante y mejor estudiado por el impacto provocado en 1840 en la hambruna europea. Agente causal responsable de la enfermedad del tizón tardío de la papa (Bary,1876) o mildiu en plantas hospedadoras como suele ocasionalmente darse en pepino dulce (*Solanum muricatum*), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y berejena (*S. melongena*), entre otras solanáceas (Dyer et al., 1993).

P. infestans es heterotático.

Se manifiesta **en la hoja** (figura 6), concretamente en el borde de la hoja, con manchas de color negro púrpura o marrón intenso rodeadas ocasionalmente por un halo amarillento, que posteriormente se expanden por la hoja hasta el tallo. Además, en el envés de la hoja se puede apreciar un polvillo blanquecino-grisáceo, tratándose del

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

micelio y esporangios del patógeno. Conforme va avanzando la enfermedad, se puede observar como las manchas se ennegrecen, llegándose a necrosar el tejido vegetal.

En el tallo (figura 7), estas manchas son del mismo tono, pero más alargadas. Una vez que la enfermedad ha alcanzado y se ha manifestado por todo el cuello de la planta, este llega a necrosarse y finalmente acaba quebrándose.

Por último, en los **tubérculos** (figura 8) también se dan unos síntomas característicos manifestados por dicha enfermedad. Se da una coloración rojiza, pudrición en caso de estar avanzada y superficie ligeramente hundida (Birch & Whisson, 2001; Infoagro, 2018).



Figura 6. Síntomas en hoja de P. infestans Fuente: Ephytia (2021)



Figura 7. Síntomas en el tallo de P. infestans. Fuente: Henfling (1987)



Figura 8. Manifiesto de P. infestans en tubérculo. Se puede apreciar una coloración rojiza y una podredumbre blanda. Fuente: Fry (2008)

1.4.3 Mecanismos de antagonismo

Las interacciones de tipo antagonista se basan en el diálogo molecular y se encuentran mediadas por la expresión diferencial de los genes.

Con el antagonismo se pretende estudiar la capacidad antagónica del hongo, para conducir a un control significativo de enfermedades. Para ello, es fundamental comprender los mecanismos de acción que pueden mostrar los microorganismos endofíticos hacia una plaga o patógeno (los antagonistas), estos son diversos y dependen tanto del antagonista escogido como del ciclo de vida del patógeno (Prada et al., 2009).

Cabe destacar entre todos los patógenos, *Trichoderma sp.* Este posee una alta capacidad para antagonizar con éxito el crecimiento de un amplio espectro de patógenos vegetales (Verma et al., 2007; Marra et al., 2019), además de ser conocido por su rápido crecimiento.

En general, en el antagonismo no se da un único modo de acción, involucrando más de un mecanismo.

Según Cook y Baker (1983), los conocimientos llevados a cabo sobre dichos mecanismos de acción involucran:

1.4.3.1 Antibiosis

Gottlieb y Shaw (1970) explican que se trata de la acción de una sustancia producida por un organismo que inhibe el crecimiento de otro organismo, tratándose de una sustancia tóxica. Estas actúan en bajas concentraciones, menores a 10 ppm.

Se da la secreción de antibióticos, toxinas y compuestos orgánicos volátiles, además del desarrollo de enzimas, las cuales degradan la pared celular extracelular como es el caso de la pectina metilesterasa y quitinasa, entre otras (Shoda, 2000; Compant et al., 2005).

Según Danielsson et al., (2007), cuando se trata de un hongo endofítico, tendrá un escaso o nulo contacto con la plaga o patógeno. Esto implica que mecanismos de antagonismo como la competencia o parasitismo directo sean menos efectivos que antibiosis y resistencia inducida por el huésped a un hongo endofítico; es decir, mecanismos directos serían menos efectivos en este caso que los mecanismos indirectos.

Sin embargo, los estudios realizados por Vero y Mondino (1999) afirman que es preferible que la antibiosis no se considere como mecanismo principal de acción de un antagonista, ya que después de varios estudios se ha demostrado el riesgo de la existencia de cepas del patógeno que son resistentes al antibiótico, además de la producción de sustancias tóxicas (antibiótico) por parte del antagonista. Un ejemplo es el cultivo dual de *Epicoccum nigrum* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Cabe destacar que ha sido el mecanismo de antagonismo más estudiado.

1.4.3.2 Competencia

Es un modo de acción indirecto, en el cual no tiene lugar la acción directa del antagonista sobre el patógeno. Se trata del enfrentamiento entre ambos organismos con desigual comportamiento ante un mismo requerimiento, imponiéndose uno de ellos y reduciendo la cantidad de nutrientes, oxígeno o espacio disponible para el otro para su desarrollo.

Las competencias más comunes son por nutrientes y agua, oxígeno y espacio.

En el caso de la competencia por espacio, el antagonista cubre toda la superficie evitando así el establecimiento del patógeno (Gottlieb & Shaw, 1970).

Dos hongos de postcosecha típicamente dependientes de los nutrientes, porque sus esporas así lo requieren, son *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, para así poder germinar y que se produzca el crecimiento de las hifas.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Es interesante mencionar algunas de las características que un antagonista debe tener para ser un efectivo competidor (Droby & Chalutz, 1994):

-Ser capaz de adaptarse mejor que el patógeno al ambiente en donde se dará la competencia

-Lograr una rápida colonización del sitio de acción

-Poseer una alta capacidad de utilizar nutrientes a bajas concentraciones

1.4.3.3 Interacciones directas con el patógeno

Existen dos tipos de interacciones directas: parasitismo y predación

Parasitismo: se refiere a la relación biológica establecida entre dos organismos, en la cual el parásito depende del huésped, es decir, se trata de la utilización del patógeno como alimento para su antagonista. Puede considerarse como una simbiosis antagónica entre organismos (Melgarejo 1989, Ulhoa 1996).

Predación: como recogen Vero y Mondino (2001) en su artículo “Control biológico postcosecha”, en este caso se refiere a que el antagonista se alimenta de materia orgánica ente la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. Este mecanismo de acción no se le ha considerado muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol.

1.4.3.4 Resistencia inducida por el huésped

Se ha demostrado, en el caso de levaduras utilizadas para el biocontrol de patógenos, que además de competir por espacio y nutrientes, son capaces de inducir resistencia en la planta (Mondino & Vero, 2006).

La resistencia inducida se estudia como método válido de manejo de enfermedades de las plantas desde 1990 aproximadamente, siendo el primer documento publicado en 1901 por Beauverie, donde demostró públicamente cómo una cepa débilmente virulenta de *Botrytis cinerea* proporcionó resistencia a cepas más virulentas del hongo (Gómez & Reis, 2011). No fue hasta 1960, cuando Joseph Kuc descubrió la primera evidencia bioquímica de resistencia inducida. Desde entonces, no se ha dejado de demostrar en varios estudios cómo las plantas poseen la capacidad natural de defenderse de los agentes fitopatógenos a través del fenómeno de resistencia (Agrios, 2005).

Posteriormente, en el año 2000 fue propuesto el término de “resistencia inducida” para denominar a todos los tipos de respuestas que provocan protegerse de las plagas a las plantas (Bonaldo et al., 2005).

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

En comparación con el control químico tradicional, la resistencia inducida presenta efectos inmediatos sobre la simplificación de la enfermedad (Kuč, 2001).

2. Materiales y métodos



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Material fúngico

Los hongos fitopatógenos empleados en este ensayo han sido: *Phytophthora capsici* (figura 13), *P. parasitica* (figura 11), *P. infestans* (figura 10) y *Botrytis cinerea* (figura 12), los cuales han sido obtenidos de la colección de fitopatología del departamento de Agronomía de la Universidad de Almería, al igual que el hongo endófito “CDG-17” (figura 9).

Una semana antes de comenzar el ensayo *in vitro*, se hizo la preparación de placas madre para tener micelio suficiente. Para ello, se tomaron trozos de micelio de las placas de patógenos de *Phytophthora capsici*, *P. parasitica* y *P. infestans* de la colección del departamento y fueron sembrados en medio de cultivo PDA, creciendo al menos 6 días a temperatura ambiente y de libre contaminación.



Figura 9. CDG-17

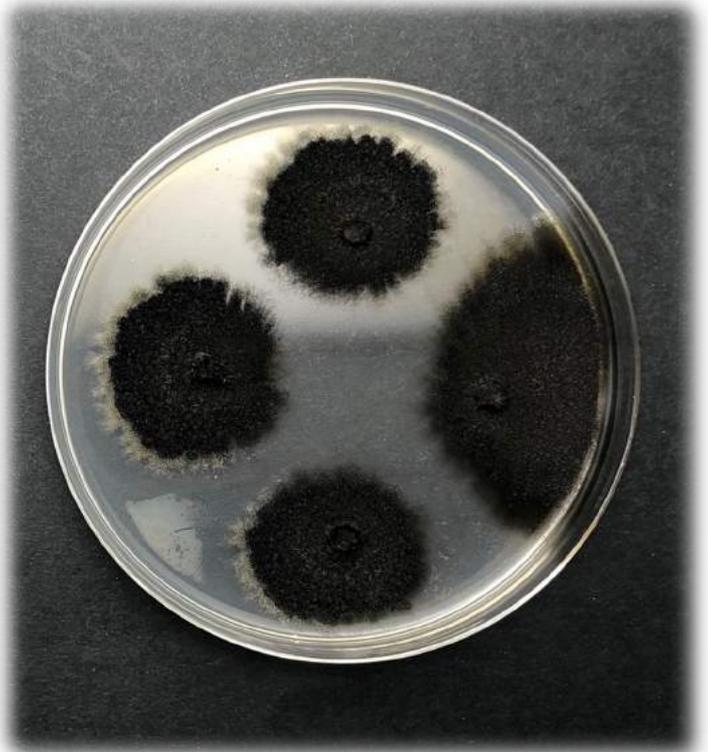


Figura 10. *Phytophthora infestans*



Figura 11. Phytophthora parasitica



Figura 12. Botrytis cinerea



Figura 13. Phytophthora capsici

2.1.2 Material vegetal

Se han utilizado semillas de pepino para el ensayo *in vivo*.



Figura 14. Semillas de pepino. Fuente: Cornet (2021)

2.1.3 Material de laboratorio

A continuación, se muestra una lista de los instrumentos empleados:

- A. Pulverizador
- B. Autoclave
- C. Balanza o peso
- D. Estufas



B



D



D



C

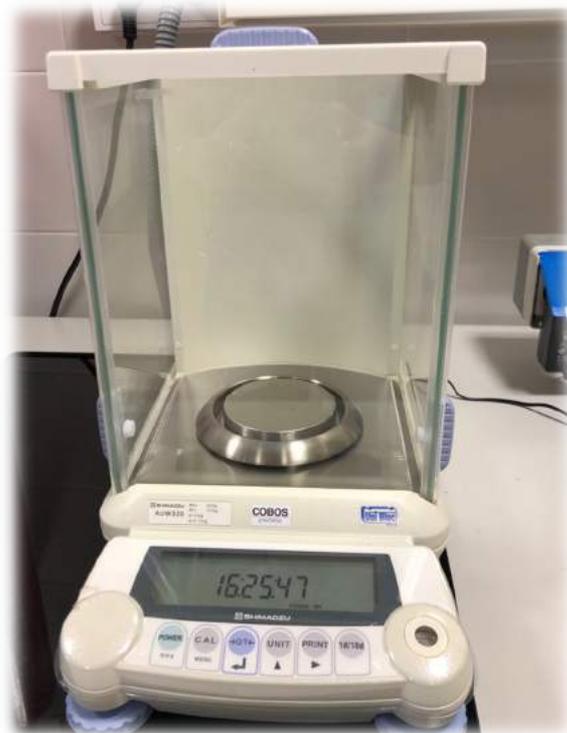


Figura 15. Instrumentos empleados en el ensayo. A-Pulverizador, B-Autoclave, C-Peso, D-Estufas.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Los productos utilizados fueron:

- Patato Dextrose Broth y Agar para el medio de cultivo
- Sal común
- Sustrato



Figura 16. Potato Dextrose Broth

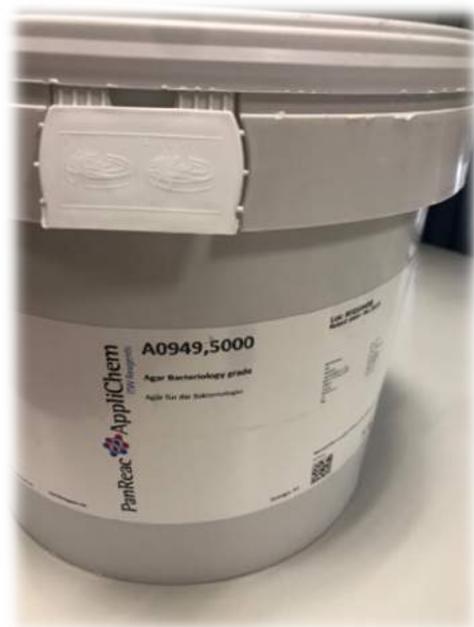


Figura 17. Agar

Otros materiales utilizados:

- | | | |
|----------------|-------------------------|-------------------------------|
| 1. Sacabocados | 6. Alcohol | 11. Cuchara |
| 2. Lanceta | 7. Papel de fieltro | 12. Papel de aluminio |
| 3. Pinza | 8. Bandejas | 13. Maceteros |
| 4. Mechero | 9. Rotulador permanente | 14. Placas de Petri de 8,5 cm |
| 5. Parafilm | 10. Reglas de medir | 15. Botellas de 1L |
| | | 16. Agua destilada |



Figura 18. Materiales empleados en el ensayo

2.2 Localización del ensayo

La realización del ensayo tuvo lugar en la universidad de Almería, el ensayo *in vitro* en los laboratorios 2.03 y 2.12 de la Escuela Superior de Ingeniería (figura 19), y el ensayo *in vivo* se realizó en el exterior, en un invernadero de pequeño tamaño situado en la parte trasera de este edificio (figura 20).



Figura 19. Vista aérea de la Escuela Superior de Ingeniería en la Universidad de Almería. Fuente: Google maps (2021)



Figura 20. Pequeño invernadero para el ensayo in vivo

2.3 Diseño experimental

2.3.1 Ensayo *in vitro*

Los patógenos utilizados en este ensayo fueron: *Phytophthora capsici*, *P. parasitica* y *P. infestans*, además del hongo endófito CDG-17.

La técnica llevada a cabo ha sido la de cultivos duales en placas de Petri de 8,5 cm de diámetro, teniendo la ventaja, además de ser la más económica, de permitir evaluar un gran número de microorganismos en un espacio tan reducido y en poco tiempo. Esta técnica permite detectar fácilmente en la mayoría de los ensayos la inhibición del crecimiento por parte de antibióticos, destrucción de hifas del patógeno producidas por el antagonista o por parasitismo directo.

El ensayo consta de 7 tratamientos, cada uno de ellos con una concentración salina diferente, siendo 0 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L y 20 g/L y a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C. En cada tratamiento hay 5 repeticiones.

Por un lado, se hicieron estos tratamientos con CDG-17 enfrentado al patógeno correspondiente, repitiendo los mismos tratamientos para el control, en donde solo se cultivó el patógeno para ver su evolución del crecimiento.

A continuación, se muestra en una tabla cómo se ha llevado a cabo la organización del ensayo en cada patógeno, mostrando el número de placas de Petri que se han utilizado:

Tabla 2. Distribución de placas de Petri en el ensayo con el patógeno P. parasitica

PHYTOPHTHORA PARASITICA	20°C		25°C		30°C	
	CDG17- Pp	Pp	CDG17- Pp	Pp	CDG17- Pp	Pp
Concentraciones salinas (g/L)						
0	5	5	5	5	5	5
1	5	5	5	5	5	5
2	5	5	5	5	5	5
5	5	5	5	5	5	5
10	5	5	5	5	5	5
15	5	5	5	5	5	5
20	5	5	5	5	5	5
Total placas	35	35	35	35	35	35

Tabla 3. Distribución de placas de Petri en el ensayo con el patógeno P. capsici

PHYTOPHTHORA CAPSICI	20°C		25°C		30°C		
Concentraciones salinas (g/L)	CDG17-Pc	Pc	CDG17-Pc	Pc	CDG17-Pc	Pc	
0	5	5	5	5	5	5	210
1	5	5	5	5	5	5	
2	5	5	5	5	5	5	
5	5	5	5	5	5	5	
10	5	5	5	5	5	5	
15	5	5	5	5	5	5	
20	5	5	5	5	5	5	
Total placas	35	35	35	35	35	35	

Tabla 4. Distribución de placas de Petri en el ensayo con el patógeno P. infestans

PHYTOPHTHORA INFESTANS	20°C		25°C		30°C		
Concentraciones salinas (g/L)	CDG17-Pinf	Pinf	CDG17-Pinf	Pinf	CDG17-Pinf	Pinf	
0	5	5	5	5	5	5	210
1	5	5	5	5	5	5	
2	5	5	5	5	5	5	
5	5	5	5	5	5	5	
10	5	5	5	5	5	5	
15	5	5	5	5	5	5	
20	5	5	5	5	5	5	
Total placas	35	35	35	35	35	35	

Por lo que se utilizaron 210 placas de Petri por cada patógeno, haciendo un total de 630 placas.

Estas placas a su vez se distribuyeron en 6 bandejas para cada patógeno, es decir, 210 placas de cada patógeno se distribuyen en 6 bandejas, de tal manera que quedaron recogidas de la siguiente forma:

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

- 1º Bandeja → P1-17 a 20°C
- 2º Bandeja → P1-17 a 25°C
- 3º Bandeja → P1-17 a 30°C
- 4º Bandeja → P1 (Control) a 20°C
- 5º Bandeja → P1 (Control) a 25°C
- 6º Bandeja → P1 (Control) a 30°C

2.3.1.1 Metodología

Seguidamente, se indica por orden las distintas fases de desarrollo que se han ido realizando a lo largo de este ensayo junto con las técnicas específicas:

A. Etiquetado de placas y señalización de puntos

El primer paso fue etiquetar las placas de Petri con el nombre del patógeno que vamos a depositar en ellas, concentración de sal y temperatura correspondiente (figura 21). Además, con la ayuda de una regla se fue marcando:

-En la placa control o testigo: un punto a 1 cm partiendo de un extremo de la placa para depositar posteriormente, como se indicará, un solo disco del patógeno (figura 22).

-En la placa antagonista: dos puntos, uno en cada extremo de la placa, distando 1 cm del extremo (figura 23), donde se depositará CDG-17 y el patógeno antagonista encima de cada punto.



Figura 21. Etiquetado de placas



Figura 22. Marca del punto en la placa control a 1 cm del extremo



Figura 23. Marca de los dos puntos en la placa antagonista

B. Realización del medio de cultivo

Se trata de un conjunto de nutrientes y factores de crecimiento, el cual permitirá crear las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos.

Para ello, para cada patógeno es necesario preparar 7 botellas de cristal de 1L. En cada una de ellas añadimos:

- 20 g de Patata Dextrosa Broth (PDB)
- 20 g de Agar
- A cada una de las botellas se le añade una concentración diferente de sal (0,1,2,5,10,15,20 (g/L)), ya que se pretende ver cómo afecta dichas concentraciones a la capacidad antagónica.

Estas cantidades han sido pesadas en un peso o balanza, poniendo papel de aluminio en la base y pesando las cantidades correspondientes con la ayuda de una cuchara, como se muestra en la siguiente imagen:

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

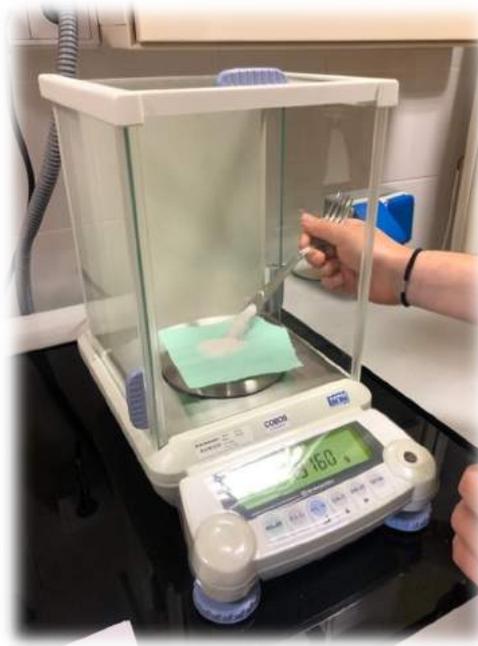


Figura 24. Pesando las cantidades necesarias para la realización del medio de cultivo

A continuación, agua para su enrasamiento, y homogeneizamos la mezcla agitando cuidadosamente los botes asegurando que esté bien cerrado el tapón de estos.

De tal manera, que las 7 botellas de 1L quedan preparadas con el siguiente aspecto:



Figura 25. Botellas con la preparación del medio

Una vez preparada la mezcla, se introducen dichas botellas en autoclave para su esterilización durante 20 minutos a una temperatura de 120 grados centígrados aproximadamente.



Figura 26. Introducción del medio en autoclave

Transcurridos los 20 minutos, una vez esterilizado el medio, se vierte en las placas de Petri (figura 27) cubriendo bien el fondo con aproximadamente 20 ml de PDA. Es importante hacerlo en un ambiente donde no se contamine, junto a la llama de un mechero Bunsen. Durante este proceso, fue preciso homogeneizar el medio frecuentemente para evitar que no se sedimentara el agar en el fondo de la botella.

Es importante no dejar abierta la placa mucho tiempo durante el vertido del medio, es conveniente cerrar rápidamente cada una de las placas de Petri cuando se vierte el medio en ellas, para evitar contaminación.

Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente en el laboratorio para que se solidificaran (figura 28).



Figura 27. Vertido del medio en las placas de Petri

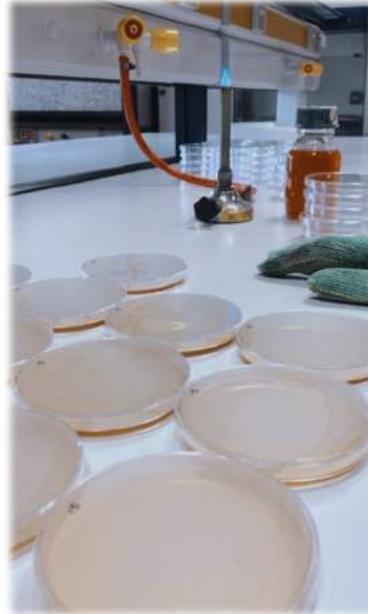


Figura 28. Enfriamiento de las placas

C. Siembra CDG-17

A continuación, se procedió a la siembra de CDG-17 en las placas de antagonismo, depositando en cada una de ellas un disco del hongo, con la ayuda de un sacabocados, en uno de los dos puntos anteriormente marcados.

Para crear un medio adecuado, lo hicimos manteniendo el mechero encendido, sacabocados, lanceta fina y alcohol (figura 29).



Figura 29. Medio adecuado para la siembra para evitar contaminación

D. Introducción de bandejas en estufas

El siguiente paso fue distribuir las placas de Petri en las bandejas como anteriormente se ha descrito en el diseño de este ensayo y se introducen en las estufas correspondientes a las distintas temperaturas para dejar incubar. Debe haber disponibles al menos 3 estufas a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C.



Figura 30. Introducción de bandejas en estufa



Figura 31. Estufas a las distintas temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C.

E. Inoculación de fitopatógenos

A las 24 horas siguientes, con ayuda de un sacabocados y una lanceta previamente esterilizados, se procedió a la inoculación de los fitopatógenos, colocando un disco del patógeno correspondiente (*Phytophthora capsici*, *P. parasitica* y *P. infestans*.) en cada una de las placas de antagonismo en el otro extremo de la placa y placas control, donde solo se depositaba un disco de cada patógeno para después

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

comprobar las diferencias junto al antagonista que va con el hongo CDG-17. El micelio del patógeno quedaba en contacto con el PDA de la placa.



Figura 32. Inoculación de los fitopatógenos en placas control y antagonistas

F. Sellado de placas

Finalmente, cerramos las placas con parafilm para evitar la contaminación de estas con otros microorganismos que puedan estar presentes en el propio ambiente y las dejamos en las estufas a las temperaturas correspondientes.



Figura 33. Sellado de las placas con parafilm

G. Medición y toma de datos

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se fotografiaron las placas y posteriormente, se midió el diámetro del crecimiento micelial de forma manual. Para ir midiendo de manera más sencilla y rápida se dibujó una línea en la placa pasando por el punto o puntos marcados anteriormente hasta el extremo final de la placa. De esta manera fuimos señalando el crecimiento diario con la ayuda de una regla y un rotulador (figura 34).

Esta etapa finaliza cuando el crecimiento micelial de los distintos controles llegue al borde opuesto de las placas.

Fue entonces cuando se procedió a la medición de cada una de esas marcas de crecimiento diario, con una regla, partiendo del disco del patógeno depositado (figura 34). Estos datos fueron procesados a Excel para después obtener unos resultados con la utilización de *Statgraphics* mediante análisis estadísticos y comparación del crecimiento del patógeno en el cultivo dual y la placa control.

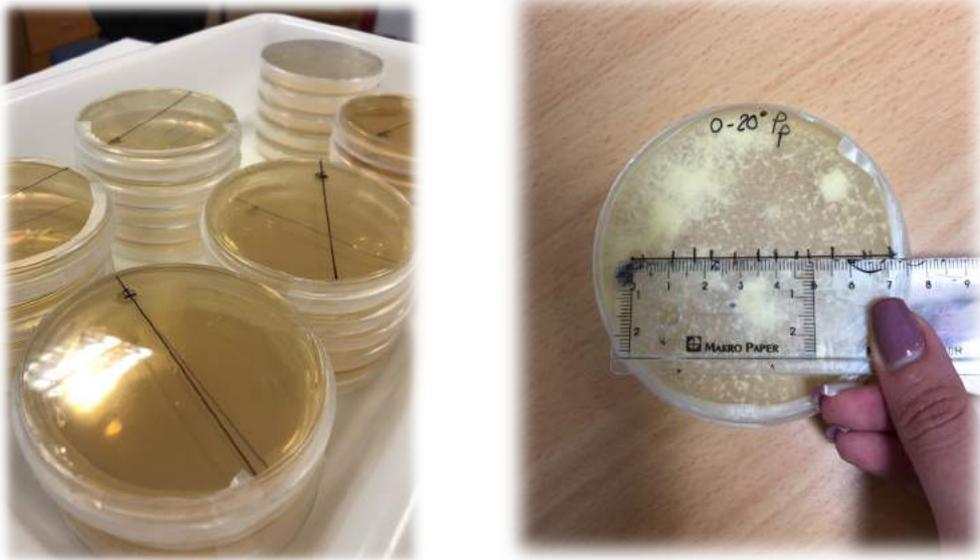


Figura 34. Medición del crecimiento

H- Análisis de datos

Con los datos obtenidos se procedió a calcular el porcentaje (%) de inhibición del crecimiento, comparando el diámetro micelial que ha crecido en las placas control con el diámetro micelial que ha crecido en las diferentes placas de antagonismo a las distintas concentraciones. Se ha llevado a cabo mediante la fórmula descrita por Abd-El-Khair & El-Gamal-Nadia (2011):

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(C - T)}{C} \times 100$$

C: promedio de la última lectura obtenida en la medición de las placas control a diferentes concentraciones

T: promedio de la última lectura obtenida en la medición de las placas antagonista a diferentes concentraciones

2.3.2 Realización del ensayo *in vivo*:

El patógeno utilizado en este ensayo fue *Botrytis cinerea*, además del hongo endófito CDG-17, ambos en placas de Petri con medio PDA adquiridos del departamento de fitopatología.

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno responsable de la podredumbre gris o también conocido como moho gris. Da lugar a infecciones caracterizadas por la aparición de necrosis y pudrición.

Este ensayo consta de 3 tratamientos (T0, T1 y T2), con 24 repeticiones en cada uno de ellos.

Tabla 5. *Tratamientos ensayo in vivo.*

T0	Testigo
T1	Botrytis
T2	Botrytis-CDG 17

T0 se compone de 24 plantas de pepino (*Cucumis sativus*) para hacer de testigo. Estas plantas sirven de referencia para comparar los síntomas de los demás tratamientos. Fueron distribuidas en 3 bandejas, 8 plantas en cada bandeja.

T1 cuenta con 24 plantas de pepino inoculadas con *Botrytis cinerea*, distribuidas en 3 bandejas, con 8 plantas en cada una.

Finalmente, T2 para el antagonismo. Este tratamiento engloba 24 plantas de pepino inoculadas con *Botrytis cinerea* y CDG-17, distribuidas en 3 bandejas, con 8 plantas en cada bandeja.

Los tratamientos son separados por una bandeja con agua para generar más humedad como se puede observar en la figura 35.



Figura 35. Distribución en bandejas de los tratamientos ensayo in vivo

2.3.2.1 Metodología

Para determinar el efecto biocontrolador de CDG-17 sobre el patosistema *Botrytis cinerea* en pepino, se procedió de la siguiente forma:

A- Preparación de maceteros

Se utilizaron maceteros de 500 ml en los 3 tratamientos. Estos fueron rellenados por una mezcla de turba comercial.

B- Inoculación de CDG-17

CDG-17 fue aplicado en el sustrato de los maceteros del tratamiento 2 (T2), de tal manera que se colocaron dos discos de 1cm de diámetro enterrados a una profundidad aproximada de 1 cm sobre la superficie con la ayuda de un sacabocados y lanceta.



Figura 36. Aplicación de CDG-17 en el sustrato

C- Desinfección de las semillas

Un mes después de la inoculación de CDG-17 en sustrato, se procedió a la desinfección de las semillas de pepino. Se introdujeron en una disolución al 2% de hipoclorito durante 3 minutos y posteriormente fueron lavadas con agua del grifo para la eliminación de todos los residuos, así como el resto de cloro, ya que puede afectar a la germinación.

D- Siembra de semillas

A continuación, las semillas fueron sembradas en las macetas de los 3 tratamientos. Se depositó una semilla por planta.

Una vez ya crecidas las plantas de pepino se procedió a la:

E- Inoculación del patógeno

La inoculación de *Botrytis cinerea* se llevó a cabo por el procedimiento de Chen & Wang (2005) en las plantas de los tratamientos T1 y T2. Para ello se realizó la apertura de una pequeña herida en el tallo con una lanceta para facilitar la posterior entrada del

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

patógeno. Con la ayuda de un sacabocados depositamos en la herida del tallo un disco de micelio de *Botrytis cinerea* que se encontraba en una placa de Petri con PDA (Figuras 37 y 38).



Figura 37. Corte en el tallo de la planta de pepino



*Figura 38. Introducción del disco de micelio de *Botrytis* en el corte del tallo*

F- Pulverización foliar

Para ensayar y estudiar la enfermedad en la parte aérea del cultivo en los tratamientos T1 y T2 se realizó además una pulverización foliar cuando la planta presentaba cuatro hojas verdaderas.

Fue necesaria la ayuda de un pulverizador, con el que se humedecieron las plántulas con una disolución en agua junto con el micelio del patógeno, con una dosis de 10^4 UFC (unidades formadoras de colonias) mL^{-1} por planta.

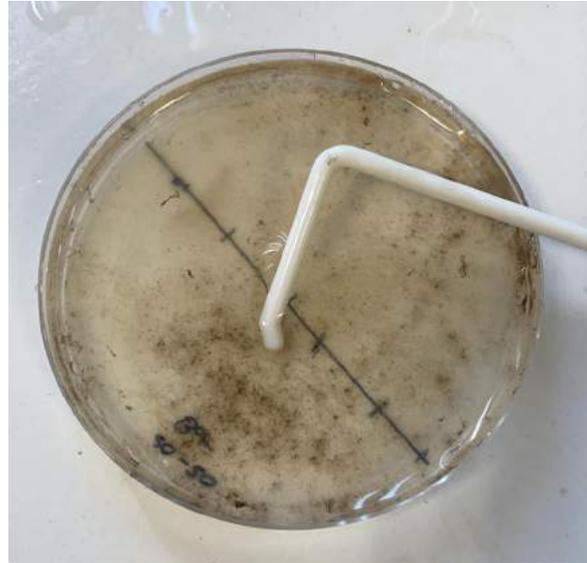


Figura 39. Pulverización foliar

G - Toma y análisis de datos

Los síntomas se midieron periódicamente 2 veces en semana aproximadamente durante 2 meses, tiempo que duró el ensayo después de la inoculación. Posteriormente, se hizo un conteo, teniendo en cuenta la siguiente valoración:

Tabla 6. Escala de valoración

Escala de valoración	
Escala	Observación
0	Planta sana (sin síntomas)
1	Síntomas moderados (25% hojas afectadas, tallo)
2	Planta afectada (50% hojas afectadas, tallo)
3	Planta afectada severamente (75% hojas afectadas, tallo)
4	Planta muerta (100% hojas afectadas, tallo)

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

La planta es afectada por *Botrytis cinerea* pudiendo comenzar la infección por una herida situada en la hoja y avanzando a través del peciolo de la hoja hasta llegar al tallo, es por ello por lo que las ponderaciones que se han tenido en cuenta en la escala de valoración se refieren al alcance que ha tenido dicha infección en la planta en cada uno de los casos afectando a hojas, tallos, y, por lo tanto, el posible marchitamiento de la planta.

Para determinar el efecto de CDG-17 sobre la planta se observó el número de plantas afectadas y el número de hojas afectadas por planta.

H- Análisis estadístico

Se ha hecho uso de el paquete estadístico *Statgraphics Centurion XV* para la realización del análisis estadístico.

Para todos los datos obtenidos, se ha realizado el test de normalidad según el criterio de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov (Chakravart et al., 1967) y la evaluación de homocedasticidad de varianzas según Test de Levene (Levene, 1960) sobre los datos.

Se ha realizado un análisis de la varianza ANOVA factorial, para proseguir con un ANOVA y separación de medias mediante el método LSD de Fisher ($p \leq 0,05$) (Fisher, 1925).

3.Resultados y discusión



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados y discusión ensayo *in vitro*

A continuación, se muestra la representación gráfica y análisis estadístico de los datos obtenidos en el estudio del crecimiento de cada uno de los tres patógenos. El objetivo de la misma es comprobar si existe influencia por la presencia de las distintas concentraciones de sal (NaCl) en el crecimiento del patógeno a las distintas temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C y posteriormente, plasmar los resultados de inhibición en el caso del antagonismo, mostrando algunas imágenes fotografiadas de los resultados de las placas de Petri, donde se puede apreciar la inhibición de crecimiento micelial.

3.1.1 *Phytophthora infestans*

3.1.1.1 Crecimiento de *P. infestans*

Centrándonos en un primer factor, como es la concentración de sal, observamos en el gráfico de la figura 40, que a medida que va aumentando la concentración de sal, el crecimiento de *Phytophthora infestans* a una temperatura de 20°C permanece sin variaciones en su crecimiento. Por lo que, la presencia de sal no influye en el crecimiento del patógeno a esta temperatura.

Observando la gráfica, se concluye que el crecimiento en el tratamiento T0 (0 g/L, sin sal) es numéricamente igual que los demás tratamientos que sí contienen concentraciones salinas. Por lo que, si hay variaciones en el antagonismo con CDG-17, no será debido a que este patógeno varíe su crecimiento por las diferentes concentraciones de NaCl.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

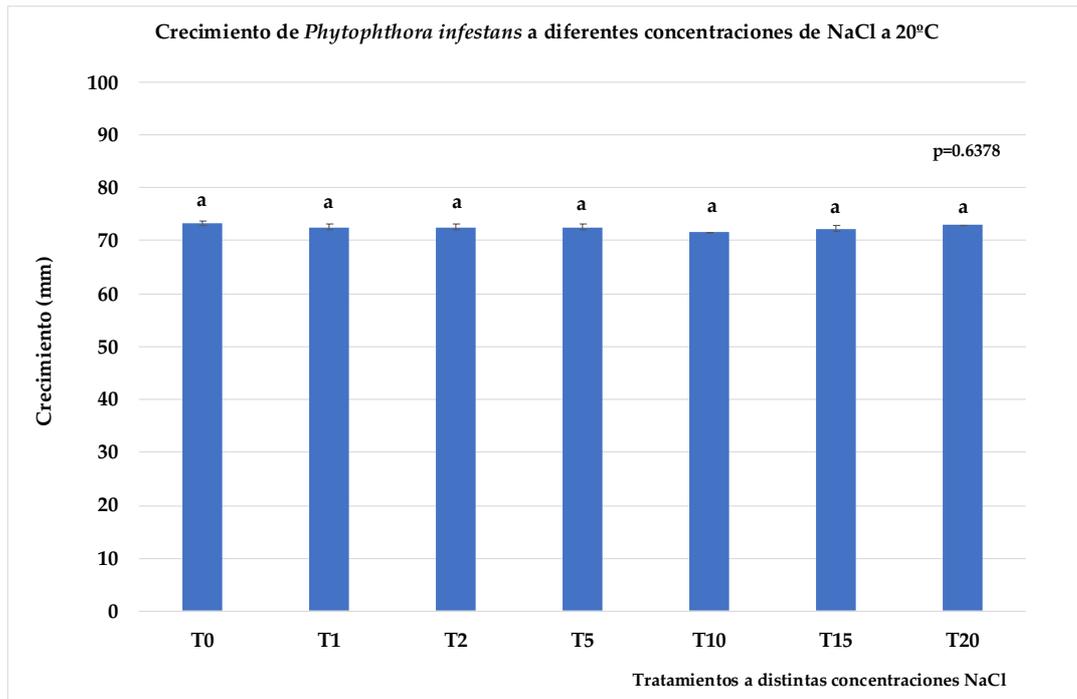


Figura 40. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de *Phytophthora infestans* en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 20°C.

De igual forma ocurre cuando *Phytophthora infestans* es sometido a las temperaturas de 25°C y 30°C, como se pueden ver en los gráficos de las figuras 41 y 42. No hay diferencias significativas, ya que el valor calculado de p es mayor a 0.05 en todos los casos.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

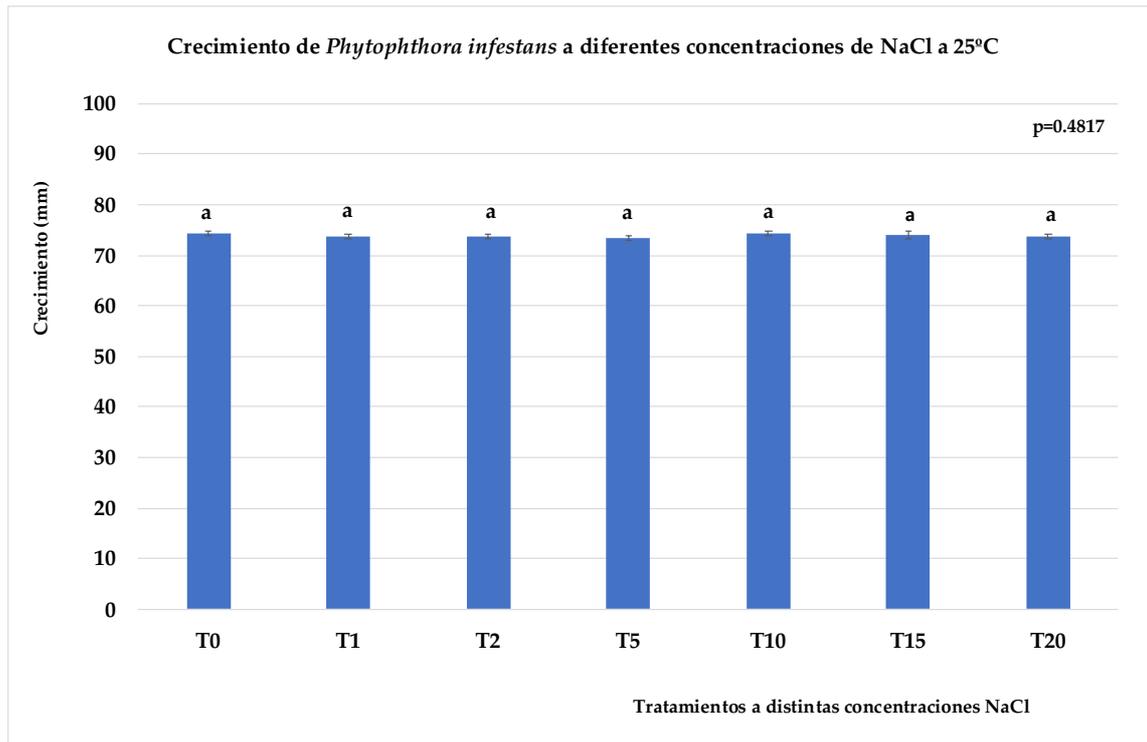


Figura 41. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de *Phytophthora infestans* en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina sometido a una temperatura de 25°C

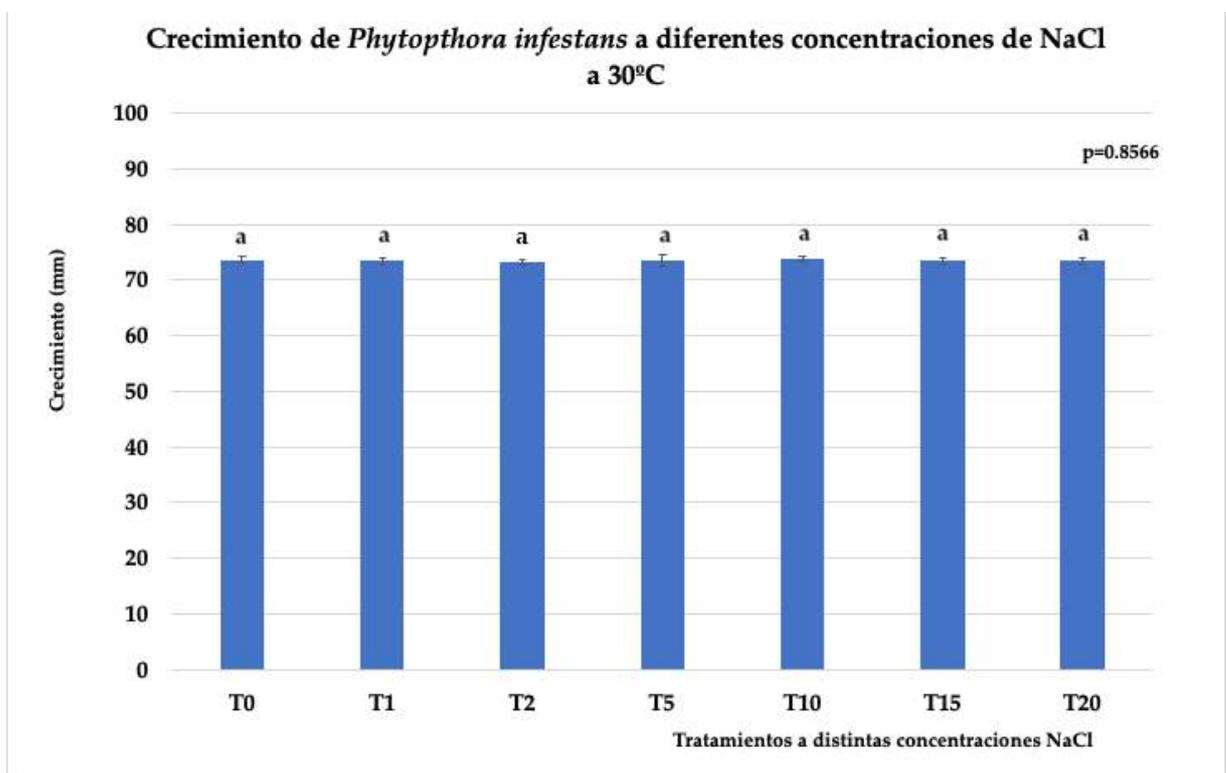


Figura 42. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de *Phytophthora infestans* en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 30°C

En forma de conclusión, la sal (NaCl) no inhibe el crecimiento micelial de *P. infestans* a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C.

3.1.1.2 Inhibición en el antagonismo de *P. infestans*

En primer lugar, se ha realizado la representación gráfica entre los distintos ensayos a diferentes concentraciones para observar el porcentaje existente de inhibición en el antagonismo.

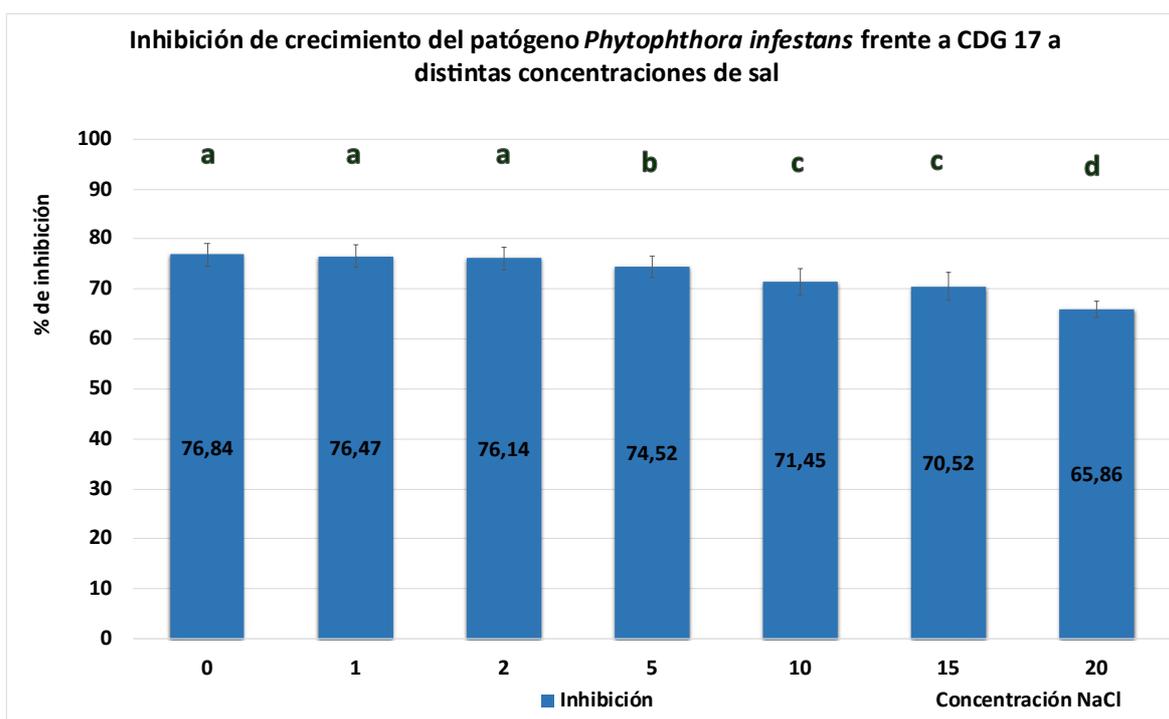


Figura 43. Representación de inhibición de crecimiento de P. infestans frente a CDG 17 a distintas concentraciones de sal

Como se observa en la figura 43, se da un incremento del porcentaje de inhibición en los ensayos con una concentración de 0 g/L, 1 g/L y 2 g/L. Estos poseen el mismo valor significativo, en comparación con los ensayos realizados a 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L y 20 g/L. Aún así, se dan porcentajes de inhibición superiores al 60%.

Cuando la concentración salina es de 0 g/L, se da un porcentaje de inhibición del 76,84%, por lo que el crecimiento micelial de *P. infestans* es retraído por la presencia de su antagonista, CDG-17, como se muestra en la figura 44 en el caso del antagonismo a una temperatura de 20°C.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

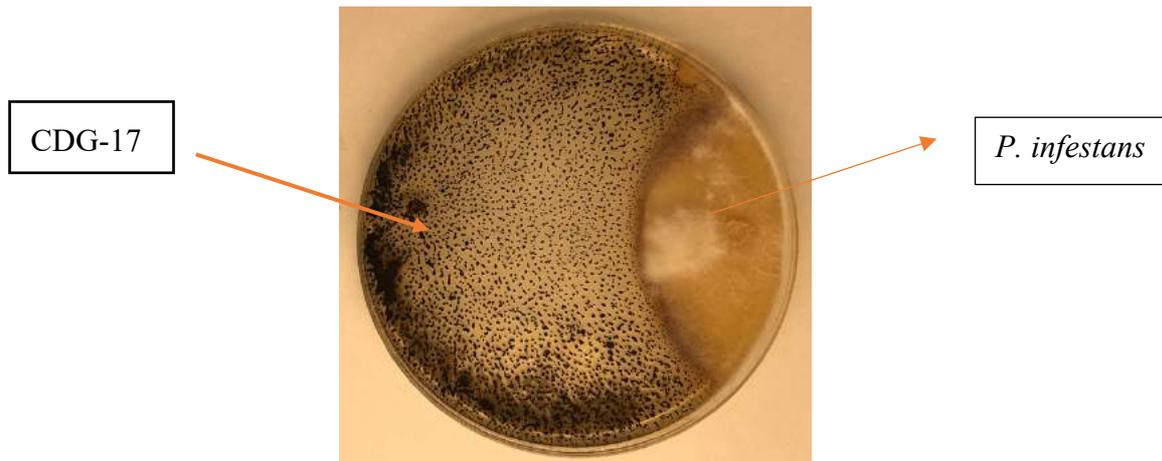


Figura 44. Antagonismo de CDG-17 y *P. infestans* a 20°C con una concentración de sal 0 g/L

Del mismo modo ocurre con los antagonismos ensayados a las concentraciones de 1 g/L y 2 g/L:



Figura 45. Antagonismo de CDG-17 y *P. infestans* a 20°C con una concentración de sal 1 g/L

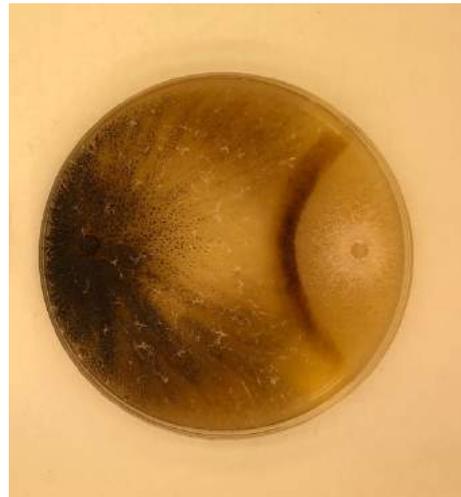


Figura 46. Antagonismo de CDG-17 y *P. infestans* a 30°C con una concentración de sal 2 g/L

Los ensayos sometidos a una concentración de 20 g/L presentan un menor porcentaje de inhibición en comparación con los demás a otras concentraciones, por tanto, el crecimiento micelial de *P. infestans* no se ve tan retraído por la presencia de CDG-17 a una concentración de 20 g/L de sal.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

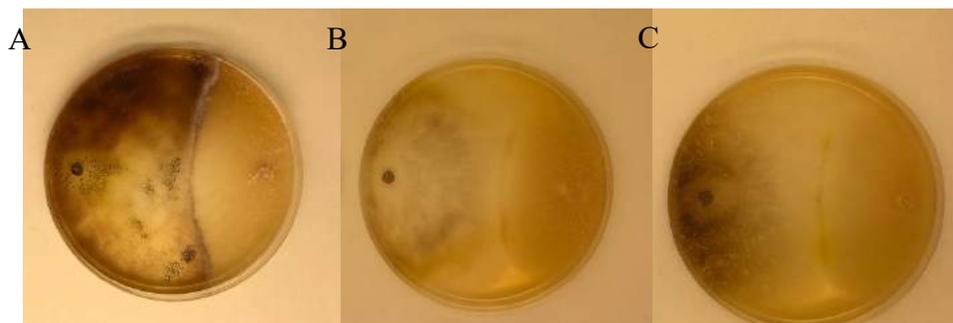


Figura 47. Antagonismo de CDG-17 y *P. infestans* con una concentración de 20 g/L a las temperaturas de A: 20°C, B: 25°C y C: 30°C.

En segundo lugar, se ha realizado una representación gráfica para observar cómo varía su inhibición de crecimiento en función de nuestro segundo factor, la temperatura.

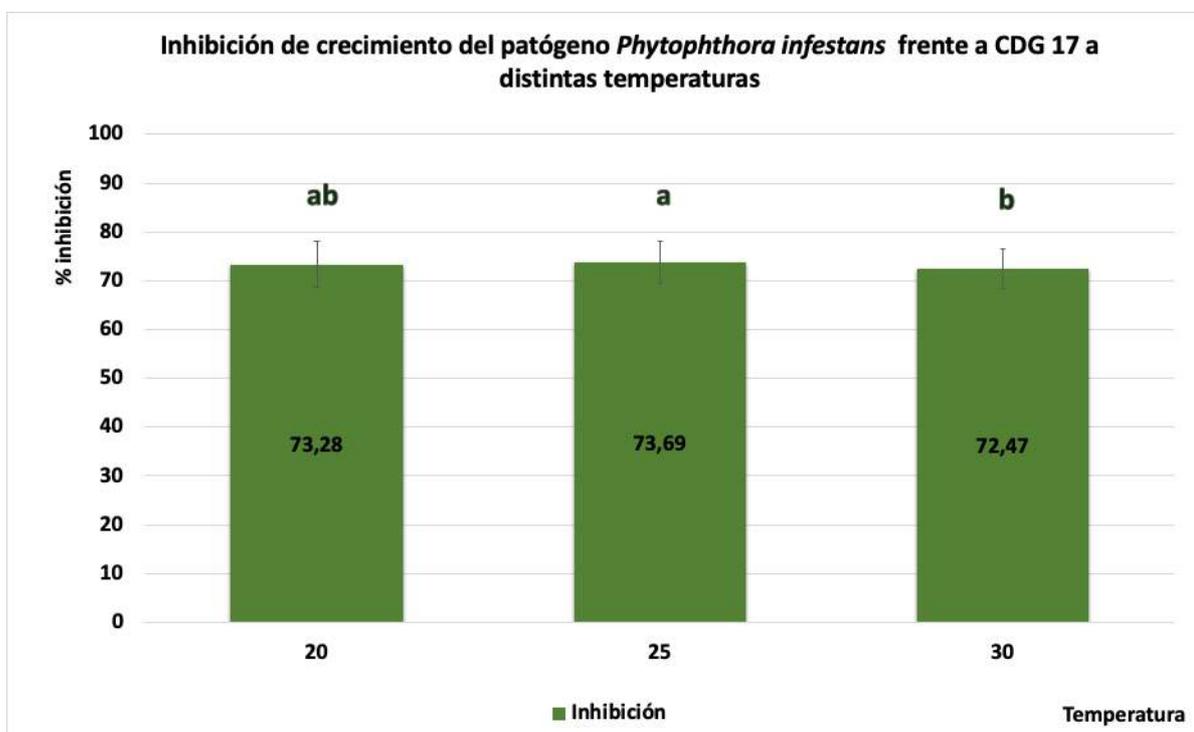


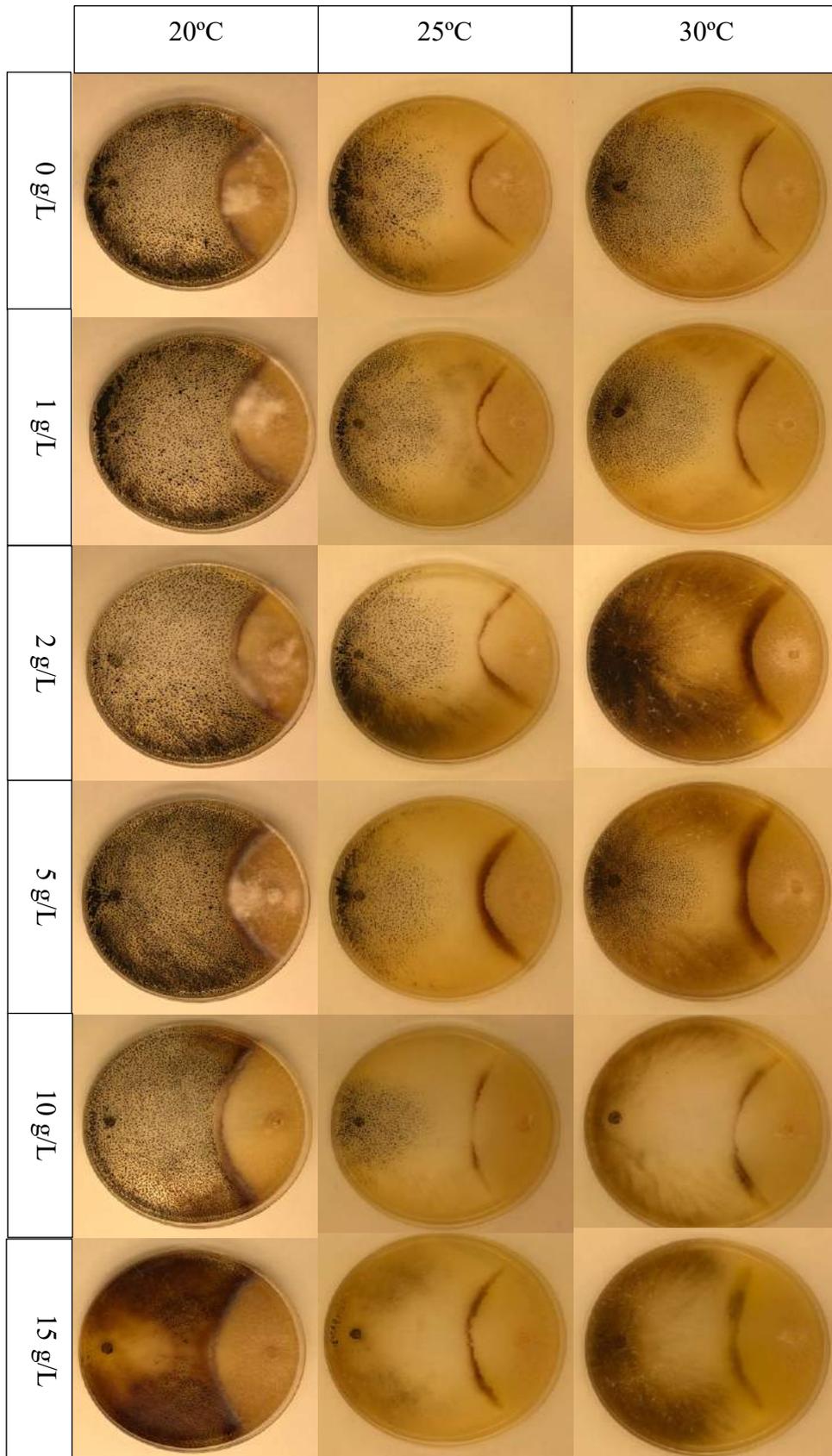
Figura 48. Representación gráfica de los valores de inhibición de crecimiento del patógeno *P. infestans* frente a CDG-17 a distintas temperaturas.

Haciendo referencia a la gráfica de la figura 48, se puede observar cómo el porcentaje de inhibición es mayor en los ensayos sometidos a la temperatura de 25°C en comparación con los sometidos a las temperaturas de 30°C y 20°C. A valores más altos de temperatura, como es el caso de 30°C, se produce un valor de inhibición inferior.

Sin embargo, no es tan notable la diferencia de inhibición entre temperaturas, todas suponen un porcentaje entre 72-74%.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

A continuación, se muestran imágenes del ensayo de antagonismo de *P. infestans* y CDG-17 para confrontar los valores obtenidos en la representación gráfica y lo observado en dichas imágenes.



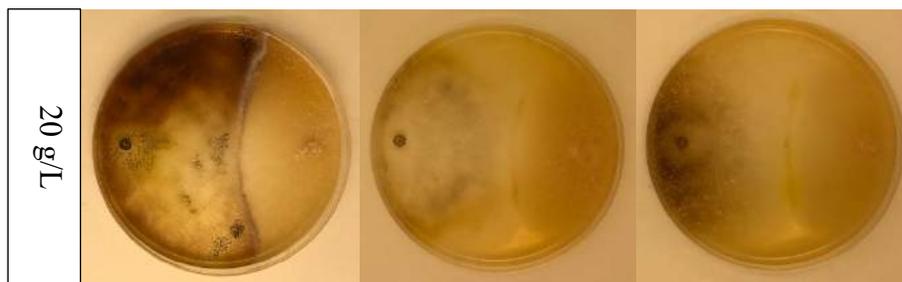


Figura 49. Placas de antagonismo *P. infestans* frente a CDG-17 a diferentes concentraciones y temperatura

Por lo tanto, la inhibición que se produce a las distintas temperaturas no varía significativamente.

Finalmente, se ha realizado un análisis unifactorial para representar la inhibición de crecimiento del patógeno frente a CDG-17 a las distintas concentraciones de sal y temperaturas conjuntamente (figura 50). En él se da la interacción entre la sal y la temperatura por presentar valores de $p < 0,05$.

De color gris se ha representado el porcentaje de inhibición a la temperatura de 20°C.

De color naranja se ha representado el porcentaje de inhibición a la temperatura de 25°C.

De color morado se ha representado el porcentaje de inhibición a la temperatura de 30°C.

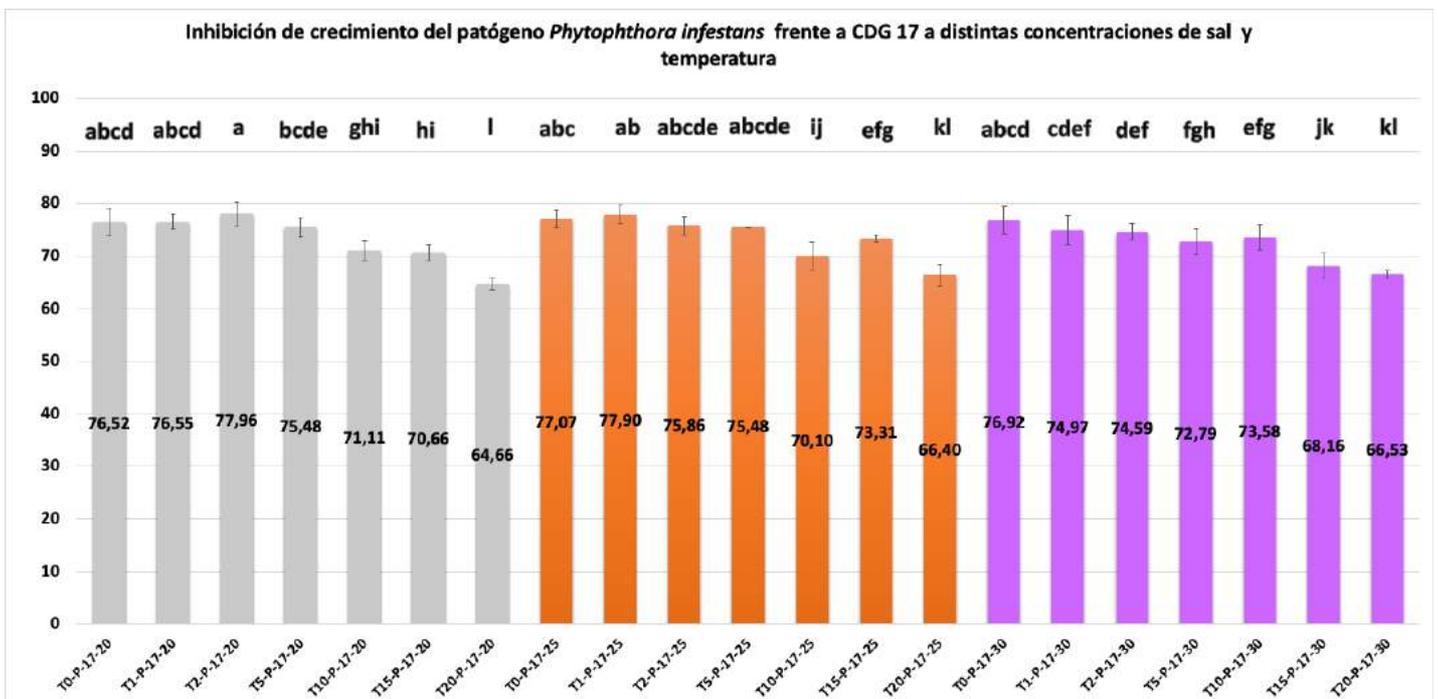


Figura 50. Representación unifactorial ensayo antagonismo *P. infestans* y CDG17

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Como observamos, a medida que aumenta la concentración de sal, se produce una disminución en la inhibición del crecimiento del patógeno, de *P. infestans*, a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C.

T2-P-17-20 presenta el mayor valor de porcentaje de inhibición, por lo que en el antagonismo a 20°C a una concentración de 2 g/L se produce un menor crecimiento de *P. infestans* aumentando el crecimiento de CDG-17.

Estos resultados muestran que el hongo endófito CDG-17 es potencialmente útil como bioplaguicida fúngico para el control de *P. infestans*.

3.1.2 *Phytophthora capsici*

3.1.2.1 Crecimiento de *P. capsici*

En el caso de *Phytophthora capsici*, se aprecia en la figura 51 una diferencia significativa: el análisis estadístico es variado. Por tanto, el crecimiento de este patógeno varía en función de la concentración de sal, dándose una mayor disminución en su crecimiento cuando es sometido a una concentración de NaCl de 15 g/L y 20 g/L a 20°C.

Por consiguiente, la presencia de sal a las concentraciones de 1 g/L, 2 g/L, 15 g/L y 20 g/L va a disminuir el crecimiento de este patógeno a la temperatura de 20°C.

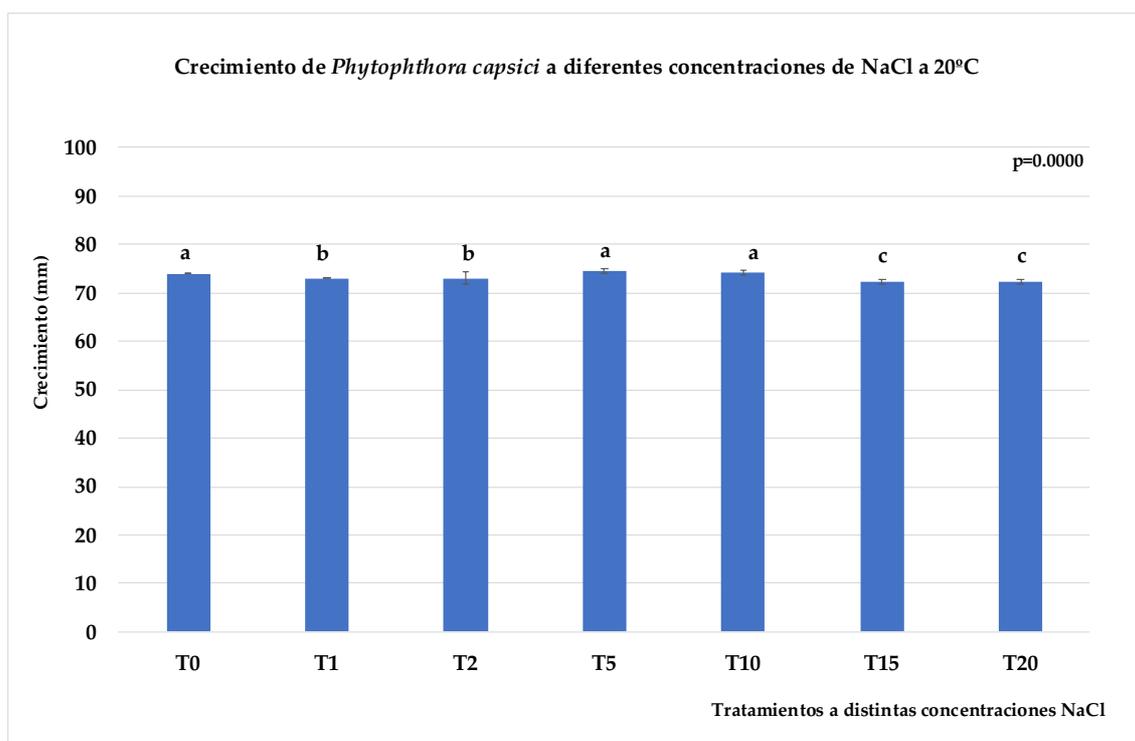


Figura 51. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de *Phytophthora capsici* en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 20°C

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Por otro lado, según los resultados de los análisis representados en los gráficos de las figuras 52 y 53 realizados a las temperaturas de 25°C y 30°C, hay variaciones significativas, $p < 0.05$.

A la temperatura de 25°C, el ensayo con una concentración de 1 g/L va a obtener un menor crecimiento del patógeno debido a la presencia de sal.

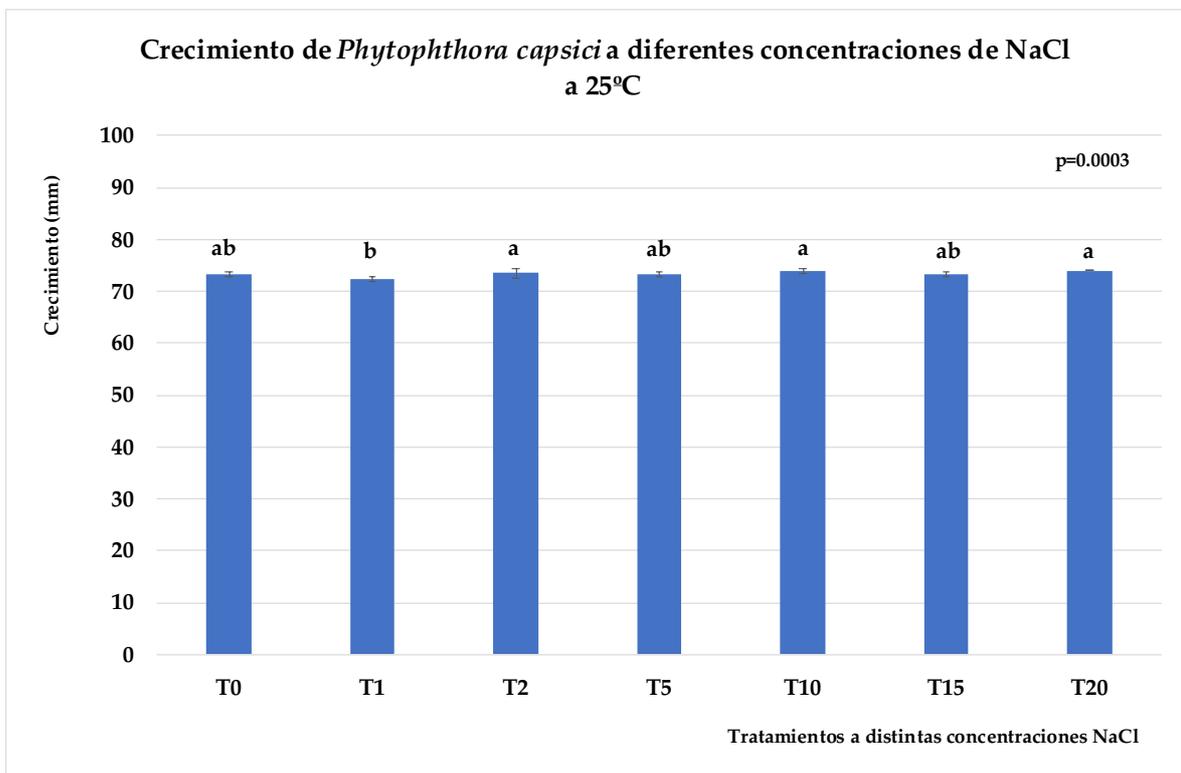


Figura 52. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de Phytophthora capsici en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 25°C

A la temperatura de 30°C, el ensayo con una concentración de 15 g/L va a tener un menor crecimiento del patógeno debido a la presencia de sal.

El patógeno va a presentar un mayor crecimiento cuando esté sometido a las concentraciones de 10 g/L y 0 g/L a una temperatura de 30°C.

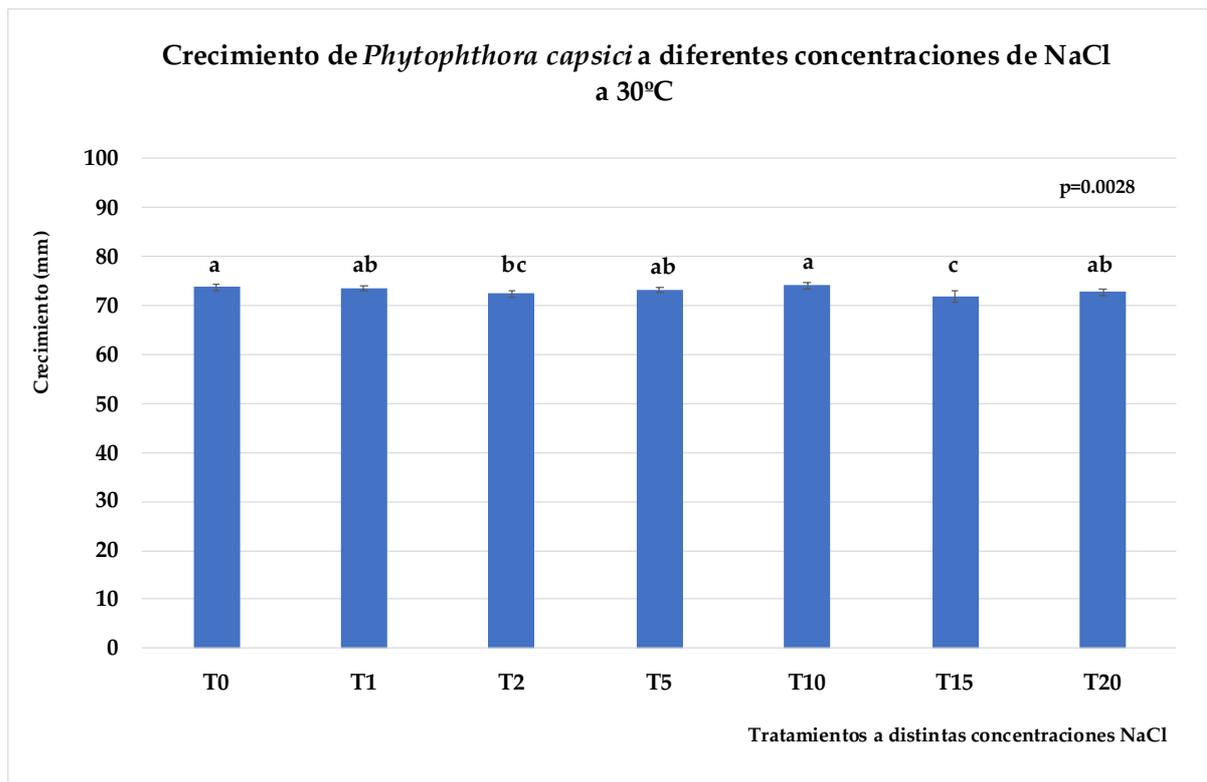


Figura 53. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de Phytophthora capsici en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 30°C

3.1.2.2 Inhibición en el antagonismo de *P.capsici*

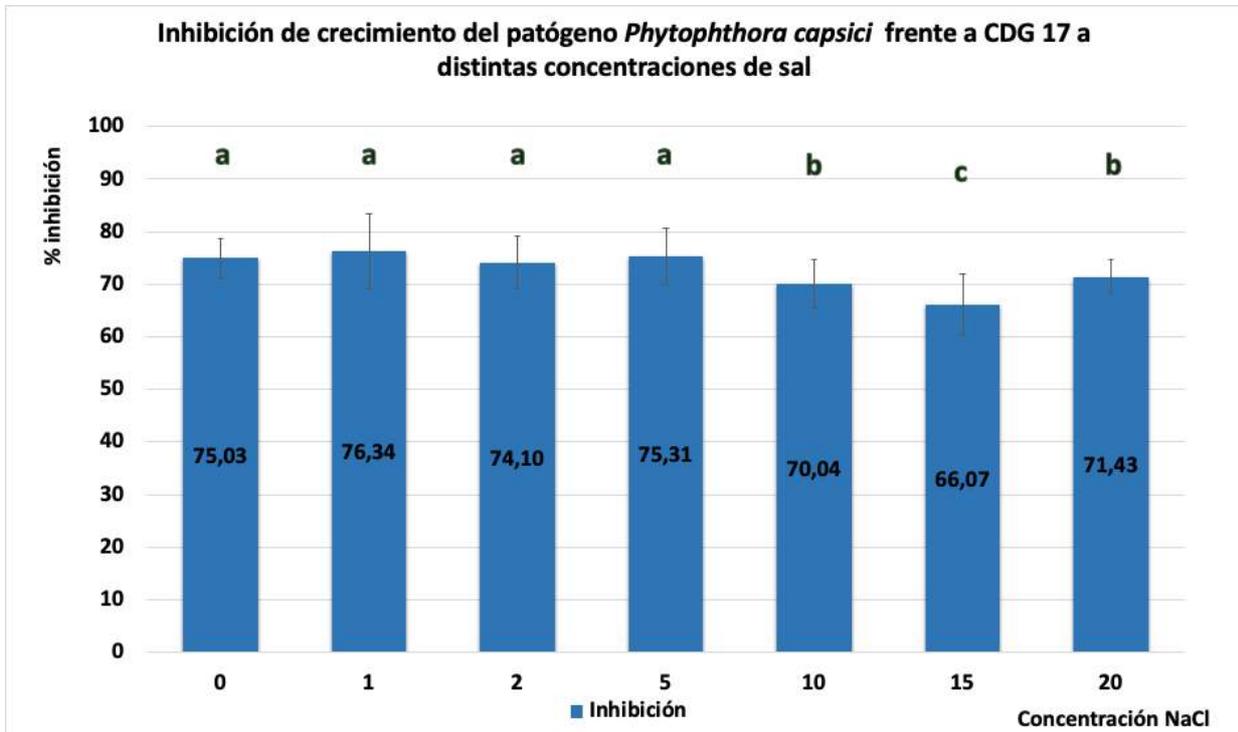
Se muestra primero una representación gráfica (figura 54), en la cual se observa cómo varía el porcentaje de inhibición en el crecimiento de *P. capsici* frente a CDG-17 por la presencia de distintas concentraciones de sal.

El porcentaje de inhibición permanece constante a las concentraciones de 0 g/L, 1 g/L, 2 g/L y 5 g/L, provocándose una disminución del porcentaje de inhibición en las concentraciones a 10 g/L y 20 g/L, y aún más en la concentración de 15 g/L. En consecuencia, se produce un mayor crecimiento del patógeno cuando está sometido a una concentración de 15 g/L.

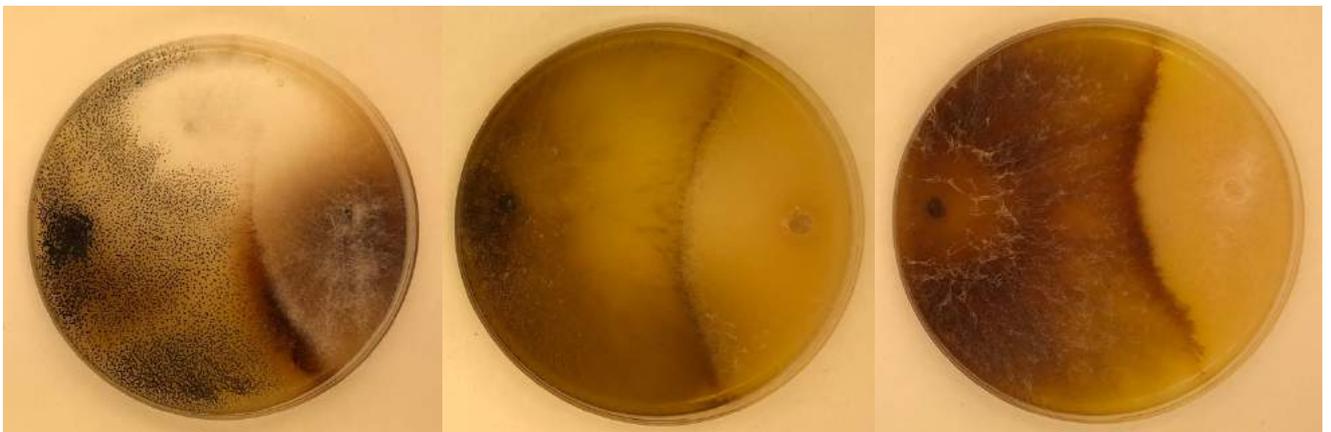
En la figura 55, se muestran cómo los ensayos antagonistas sometidos a las concentraciones de 10 g/L, 20 g/L y 15 g/L presentan un mayor desarrollo en el crecimiento de *P. capsici* al tener menos porcentaje de inhibición.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Aún así, el porcentaje de inhibición en todas las concentraciones es alto, mayor del 60%, por lo que no va a resultar ser una gran diferencia.



*Figura 54. Representación de inhibición de crecimiento de *P. capsici* frente a CDG 17 a distintas concentraciones de sal*



*Figura 55. Antagonismos de *P. capsici* frente a CDG-17 a diferentes concentraciones. A: 10g/L. B: 20 g/L. C: 15 g/L.*

Posteriormente, en la representación gráfica de la figura 56, se muestra cómo varía el porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. capsici* en el antagonismo frente a CDG-17 a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C.

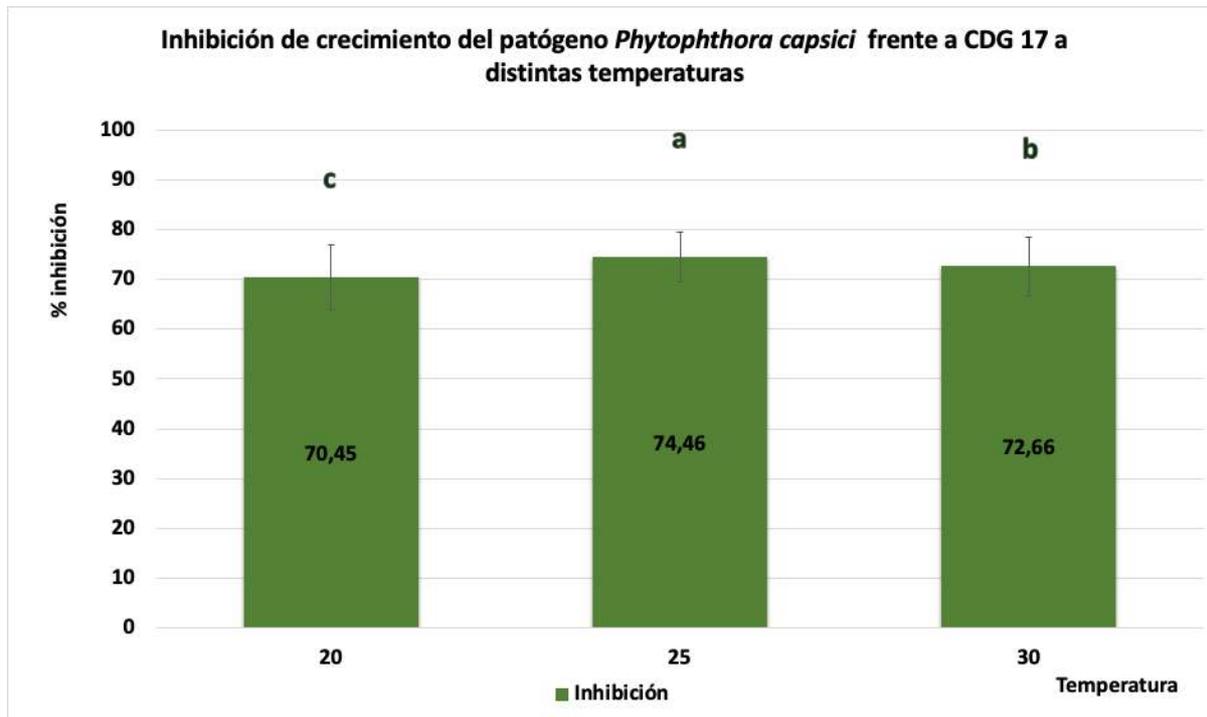


Figura 56. Representación gráfica de los valores de inhibición de crecimiento del patógeno *P. capsici* frente a CDG-17 a distintas temperaturas.

Se observa que en comparación con las temperaturas de 20°C y 30°C, se produce un mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento del patógeno a la temperatura de 25°C. De esta manera, se muestran a continuación dos imágenes tomadas de los resultados del ensayo de antagonismo. En ellas se aprecia cómo varía el crecimiento de *P. capsici* en función de las temperaturas a 25°C y 30°C.

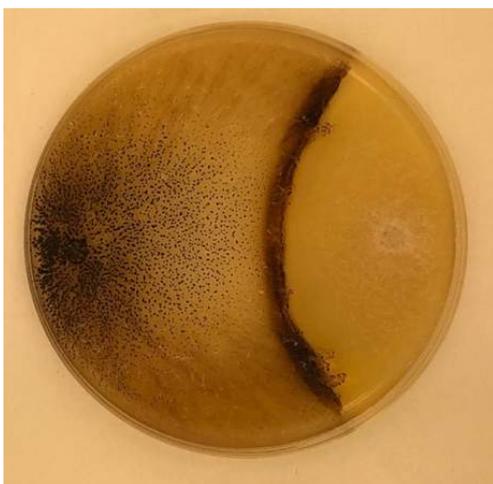


Figura 57. Antagonismo *P. capsici* a 30°C

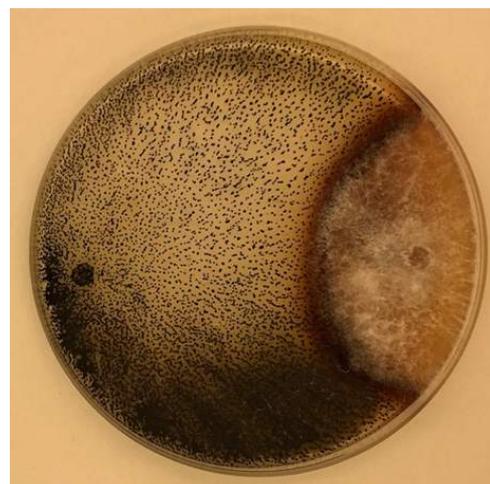


Figura 58. Antagonismo *P. capsici* a 25°C

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

P. capsici presenta un menor crecimiento en el antagonismo a 25°C por tener un mayor porcentaje de inhibición (figura 58) que en el antagonismo a 30°C (figura 57).

Finalmente, se ha realizado un análisis unifactorial en el que se muestra a través de una representación gráfica (figura 59) los porcentajes de inhibición de crecimiento del patógeno *Phytophthora capsici* frente a CDG-17 a distintas concentraciones de sal y temperatura.

De color gris se ha representado el porcentaje de inhibición a la temperatura de 20°C.

De color naranja se ha representado el porcentaje de inhibición a la temperatura de 25°C.

De color morado se ha representado el porcentaje de inhibición a la temperatura de 30°C.

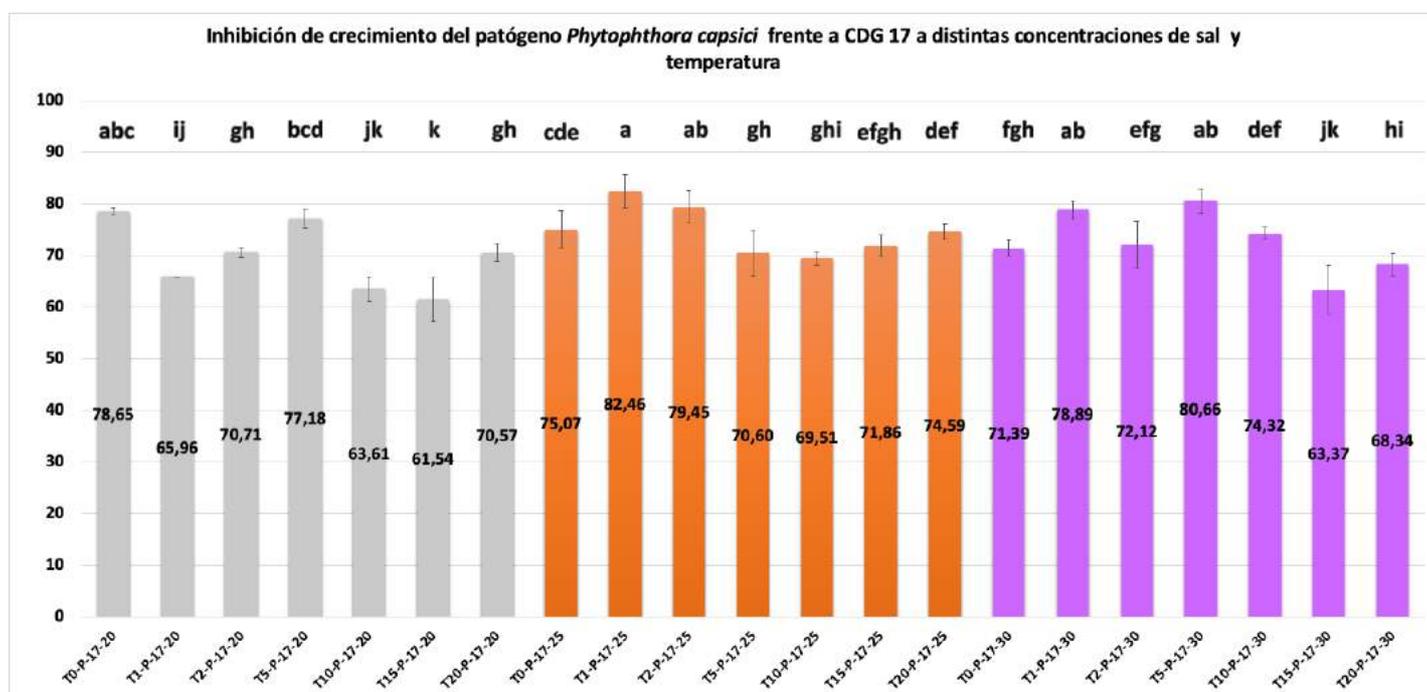


Figura 59. Representación unifactorial ensayo antagonismo *P.capsici* y CDG17

Se puede observar en la figura 59, que no hay un crecimiento o decrecimiento uniforme a medida que se va aumentando la concentración. Tanto es así, que el tratamiento que presenta un valor más alto de inhibición (82,46%) es T1-P-17-25; es decir, cuando el antagonismo está sometido a una temperatura de 25°C con una concentración de 1 g/L. Los demás tratamientos se van alejando de ese valor obteniendo resultados de menor inhibición, por lo que el crecimiento del patógeno será mayor. Aún así, todos los valores del porcentaje de inhibición están por encima del 60%. Estos son muy positivos y llegamos a la deducción de que una vez más, la presencia de CDG-17 es

positiva para impedir el crecimiento de la enfermedad producida por el patógeno *P. capsici*.

Desde otro punto de vista, el aumento de concentración de sal no tiene nada que ver con la reducción de inhibición. Tanto es así que siguiendo observando la gráfica anterior, en el caso de antagonismo a 20°C, se produce un aumento en el valor de porcentaje de inhibición cuando tiene una concentración de 20 g/L y disminuye el porcentaje de inhibición cuando tiene una concentración menor del 15 g/L, y vuelve a aumentar el valor de inhibición a la concentración de 10 g/L, por ello, como se decía anteriormente, se dan valores muy variables en todo el ensayo.

3.1.3 *Phytophthora parasitica*

3.1.3.1 Crecimiento de *P. parasitica*

Como se observa en la figura 60, en el crecimiento de *P. parasitica* a diferentes concentraciones de NaCl sometido a una temperatura de 20°C, presenta diferencias significativas con respecto al control, $p < 0,05$.

Los valores marcados con la misma letra (b) no son estadísticamente diferentes en $P = 0.0018$, ya que pertenecen al mismo grupo homogéneo.

Por lo que, con respecto al control (0 g/L), cuando *P. parasitica* es sometido a unas concentraciones salinas mayores de 1 g/L a una temperatura de 20°C, su valor medio de crecimiento disminuirá, pero no habrá ninguna diferencia de crecimiento entre resto de concentraciones. Es decir, a las concentraciones 1 g/L, 2 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L y 20 g/L de NaCl mantiene uniformemente la media de crecimiento.

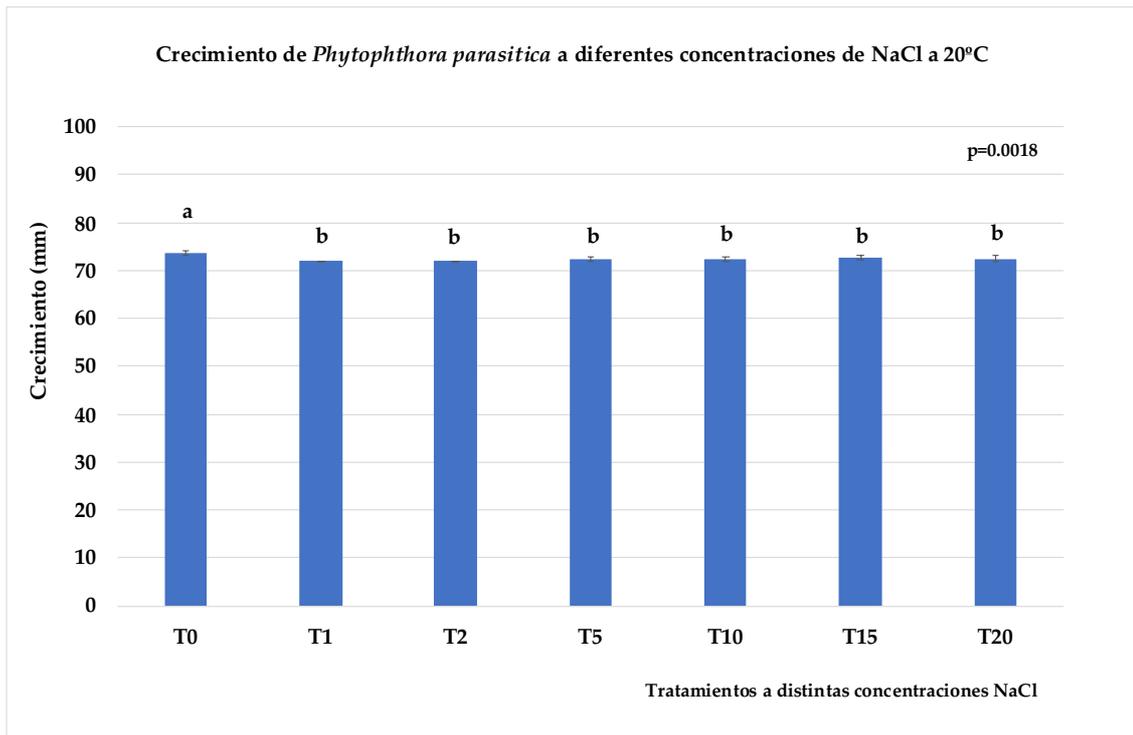


Figura 60. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de *Phytophthora parasitica* en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 20°C

De acuerdo con los resultados de Campanella et al. (2002), las sales de calcio inhiben el crecimiento micelial y la producción de zoosporas de *P. parasitica*.

Sin embargo, a una temperatura de 25 °C no se aprecian diferencias significativas en el crecimiento de *P. parasitica*, $p > 0,05$ (Figura 61). El valor medio de crecimiento de *P. parasitica* sin sal (T0) arroja los mismos resultados que cuando el patógeno posee mayores concentraciones de sal (1 g/L, 2 g/L, 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L y 20 g/L). Todo esto quiere decir que los tratamientos a distintas concentraciones pertenecen al mismo grupo homogéneo.

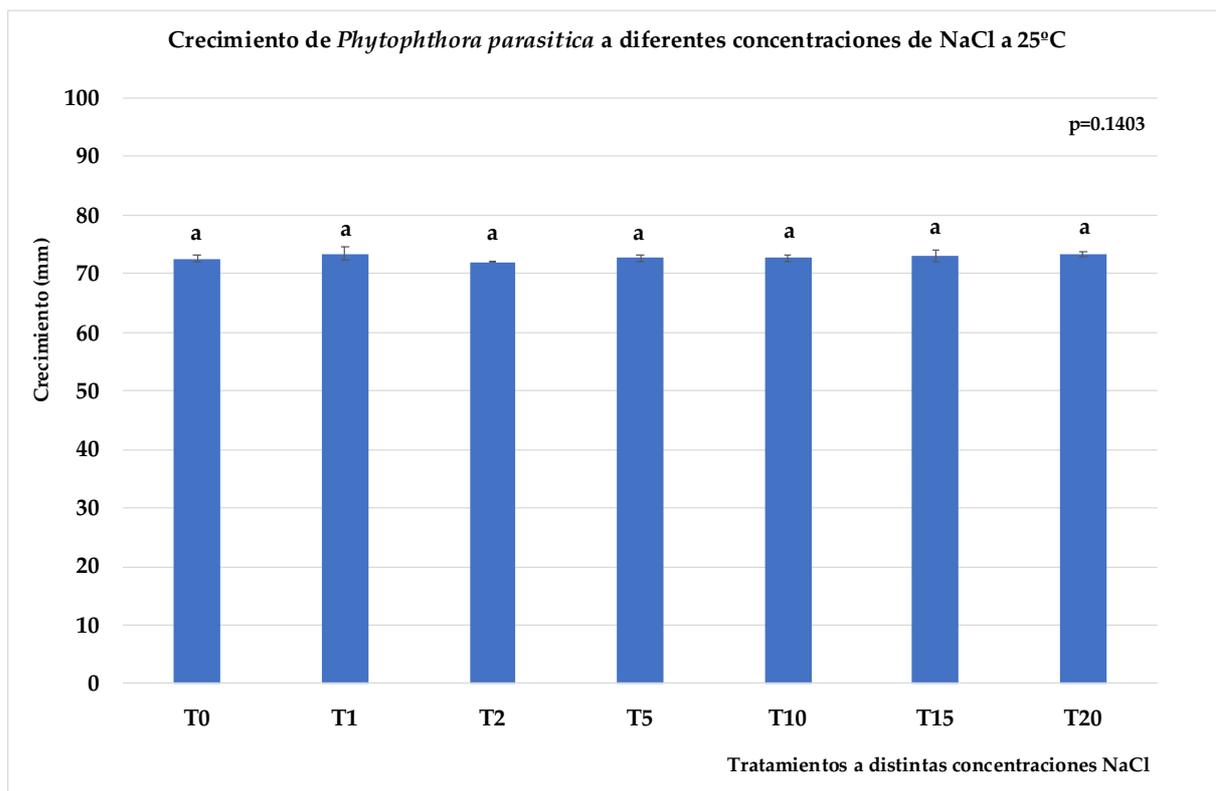


Figura 61. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de *Phytophthora parasitica* en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 25°C

Finalmente, el crecimiento de *P. parasitica* a diferentes concentraciones sometido a una temperatura de 30°C (figura 62), ha resultado tener diferencias significativas ($p < 0.05$). El tratamiento con una concentración de 2 g/L obtiene un crecimiento mayor que el resto de los tratamientos, de manera que se van alejando del valor máximo, resultando ser T15 el que posee un menor crecimiento del patógeno.

Las concentraciones de 0 g/L, 1 g/L, 5 g/L, 10 g/L y 20 g/L forman parte del mismo grupo homogéneo por la letra obtenida tras realizar el análisis correspondiente (ab).

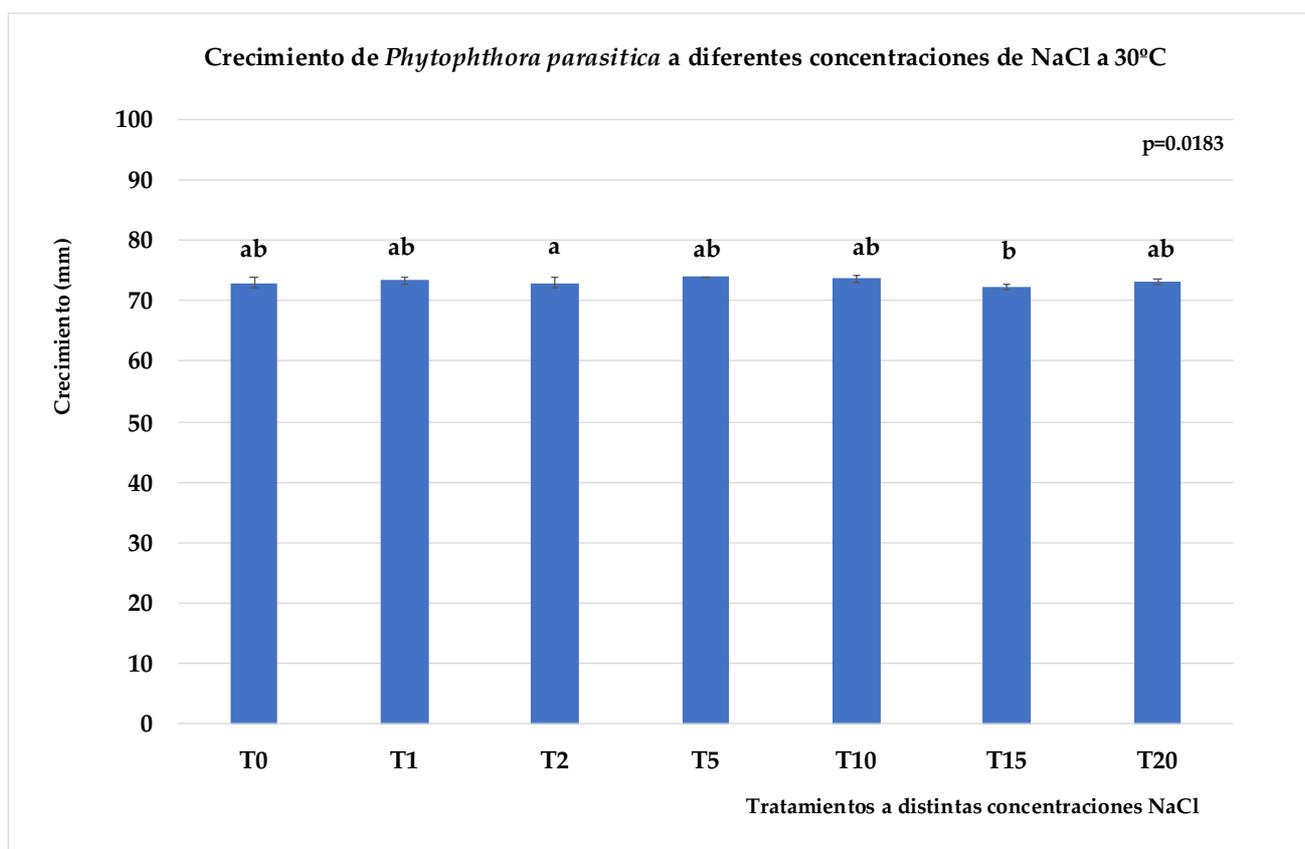
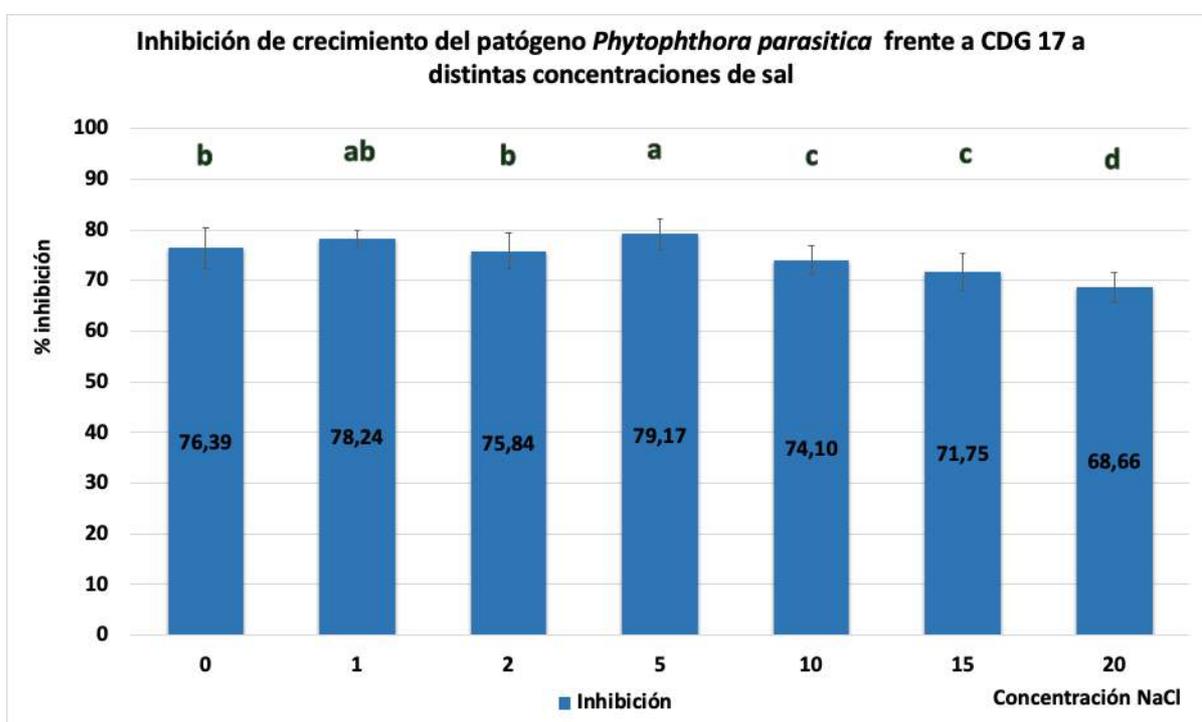


Figura 62. Representación gráfica del valor promedio de crecimiento de *Phytophthora parasitica* en cada uno de los tratamientos a distinta concentración salina, sometido a una temperatura de 30°C

3.1.3.2 Inhibición en el antagonismo de *P. parasitica*

En la representación gráfica de la figura 63, se analiza la variación en el porcentaje de inhibición dependiendo de la concentración de sal presente en los distintos tratamientos dados durante el ensayo de antagonismo con *P. parasitica* frente a CDG-17. Se muestra cómo a medida que aumenta la concentración de sal disminuye el porcentaje de inhibición, permaneciendo más o menos uniforme en las concentraciones 0 g/L, 1 g/L, 2 g/L y 5 g/L. No obstante, el porcentaje en todos los tratamientos es superior al 60%, valores que dan un buen resultado, ya que la presencia de CDG-17 afecta positivamente a la retención del crecimiento del patógeno *P. parasitica*.



*Figura 63. Representación de inhibición de crecimiento de *P. parasitica* frente a CDG 17 a distintas concentraciones de sal.*

La máxima inhibición se da a la concentración de 1 g/L (figura 64) y a 5 g/L (figura 65), perteneciendo ambos tratamientos a un mismo grupo homogéneo. Por otro lado, las concentraciones de 0 g/L y 2 g/L forman otro grupo homogéneo dando como resultado un menor porcentaje de inhibición que los anteriores. Las concentraciones de 10 g/L y 15 g/L forman un tercer grupo homogéneo, siendo un cuarto grupo la concentración de 20 g/L.

Por tanto, las máximas inhibiciones se adquieren a las concentraciones salinas de 1 g/L y 5 g/L, viéndose reducidas a las concentraciones de 0 g/L y 2 g/L, a partir de las

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

cuales el porcentaje de inhibición empieza a descender notablemente, produciéndose una menor inhibición a la concentración de 20 g/L respecto al valor máximo (figura 66).

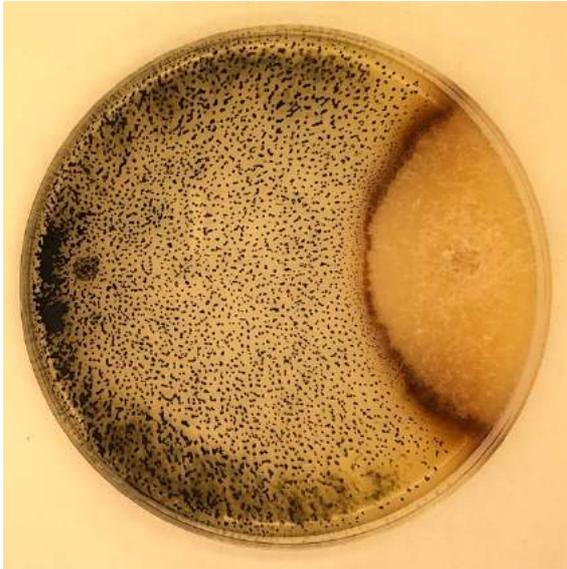


Figura 64. Antagonismo *P. parasitica* frente a CDG-17 a una concentración de 1 g/L

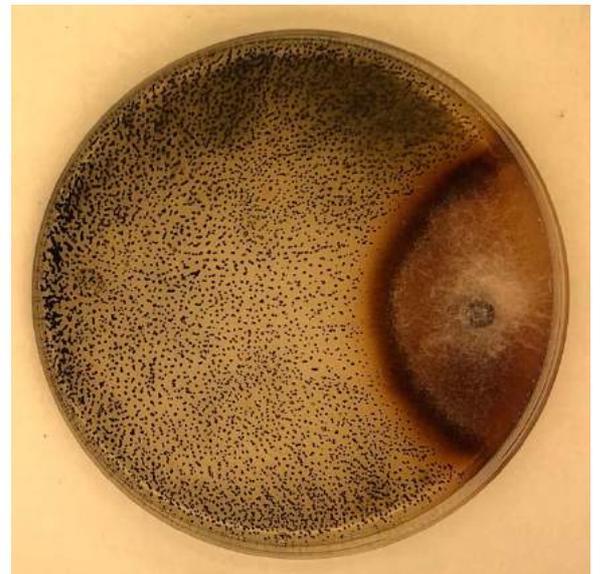


Figura 65. Antagonismo *P. parasitica* frente a CDG-17 a una concentración de 5 g/L

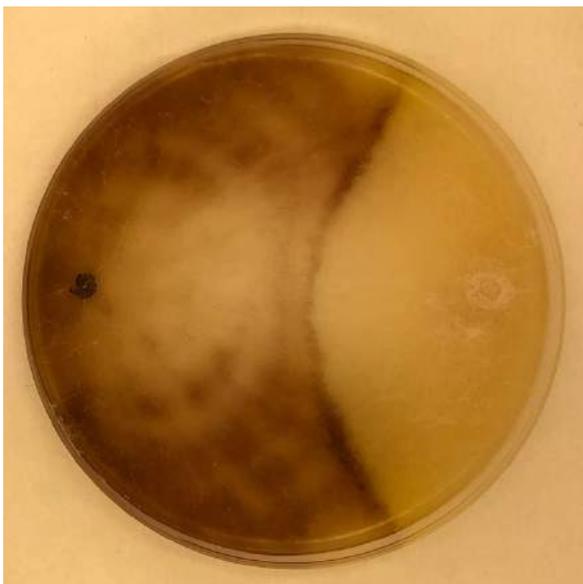
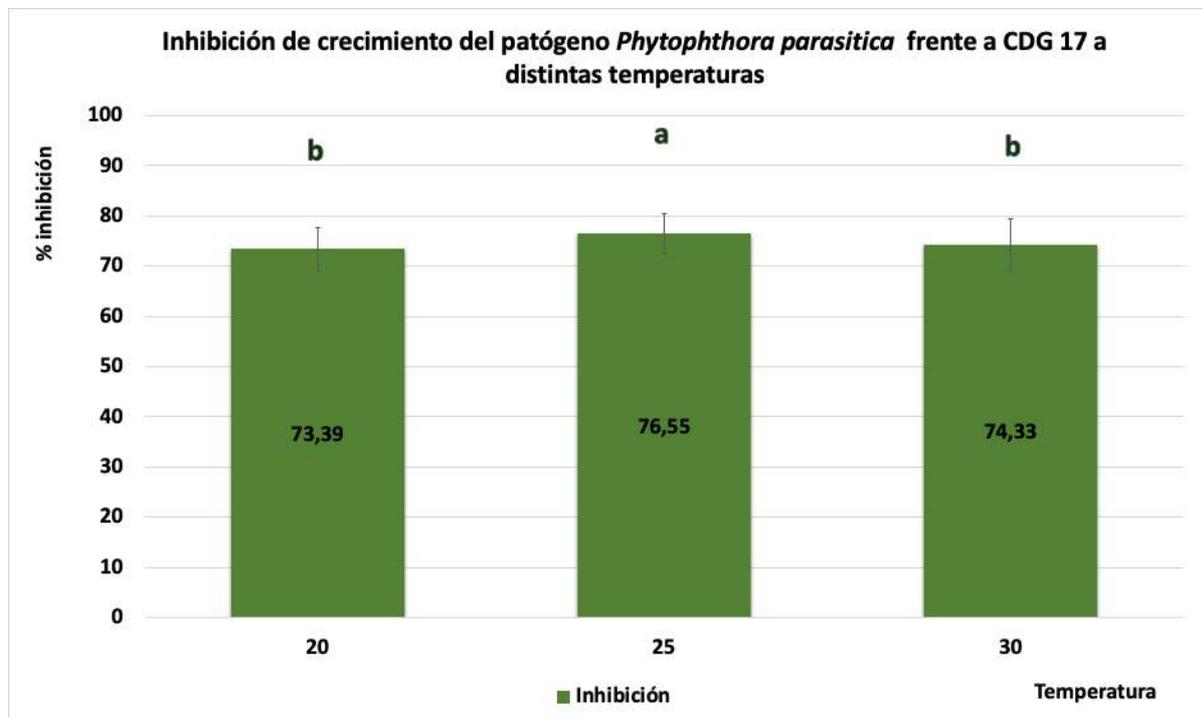


Figura 66. Antagonismo *P. parasitica* frente a CDG-17 a una concentración de 20 g/L

En una segunda gráfica, se estudia el análisis del segundo factor que influye en el antagonismo, la temperatura. Con el objetivo de ver cómo afecta a cada uno de los tratamientos y el porcentaje de inhibición dado en cada caso.



*Figura 67. Representación gráfica de los valores de inhibición de crecimiento del patógeno *P. parasitica* frente a CDG-17 a distintas temperaturas.*

Respecto a la figura 67, se observa cómo la máxima inhibición se da a la temperatura de 25°C. Las temperaturas de 20°C y 30°C presentan porcentajes de inhibición inferiores pero similares, ya que los resultados del análisis estadístico confieren la misma letra (b) para ambos tratamientos. Mientras que el tratamiento a 25°C poseen la letra (a), lo cual significa que a esa temperatura se da el máximo valor de inhibición, es decir, cuando el antagonismo es sometido a la temperatura de 25°C se produce un menor crecimiento del patógeno *P. parasitica*. No obstante, se dan valores de inhibición bastante altos a todas las temperaturas, mayores al 70%.

Finalmente, se realizó un tercer análisis estadístico, pero esta vez unifactorial, para comprobar si había interacción entre ambos factores, concentración de sal y temperatura. Resultó no tener interacciones, siendo $p > 0.05$.

Como se ha comentado anteriormente, al realizar los análisis multifactoriales de temperatura y concentración salina, se ve cómo se han obtenido unos valores de inhibición homogéneos en los tratamientos.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Según los resultados obtenidos en cada uno de los antagonismos a diferentes temperaturas y concentraciones, el uso del hongo endófito CDG-17 como agente de biocontrol es potencialmente útil, reduciendo e impidiendo el crecimiento micelial de los patógenos estudiados.

Como se ha podido observar anteriormente, la presencia de sal a las concentraciones altas de 10 g/L, 15 g/L y 20 g/L en los antagonismos de *P. parasitica* e *infestans* frente a CDG-17, se produce una disminución en cuanto al porcentaje de inhibición, por lo que el crecimiento micelial de los patógenos es mayor a esas concentraciones. Con esto llego a la conclusión, de que es mejor trabajar con CDG-17 a concentraciones más bajas de salinidad con estos dos patógenos.

En comparación con los resultados de otros autores, la sal redujo el crecimiento micelial de *Phytophthora pistaciae* a las distintas concentraciones de 1,5, 4,8 y 15 mM de cloruro de calcio. El cloruro de calcio redujo el tamaño y el volumen de los esporangios, anteridios y ovogonias. Por otro lado, concentraciones superiores a 15 mM redujo la descarga de zoosporas e incitaron la germinación del quiste (Mostowfizadeh et al., 2018).

Un estudio realizado con los patógenos de la pudrición amarga de la manzana, *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum*, el cloruro de calcio inhibió el crecimiento del tubo germinativo en un 41% en relación con el control (Biggs, 1999).

3.2 Resultados y discusión ensayo *in vivo*

3.2.1 Resultados ensayo *in vivo*

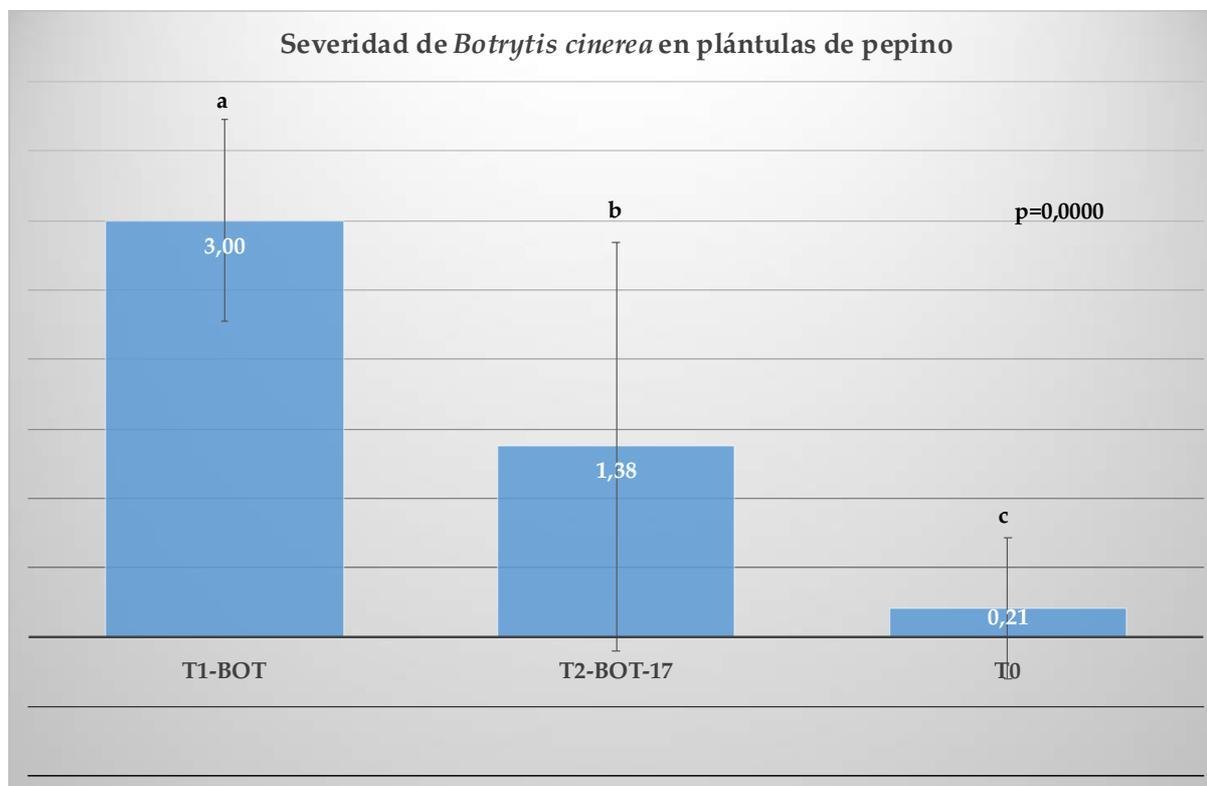


Figura 68. Representación de la severidad de *Botrytis cinerea* en plántulas de pepino.

En la figura 68, se muestran los resultados de valores medios de severidad de cada uno de los tratamientos.

Las plantas del tratamiento T1, inoculadas solamente con *Botrytis cinerea*, presentaron unos síntomas que, con la ayuda de la escala de valoración aportada en el apartado anterior (Materiales y métodos), se han posicionado en una escala media de severidad de 3, al tener en cuenta la media de todas las plantas de este tratamiento. Por lo que, dichas plantas están afectadas severamente por podredumbre gris, cuyo agente causal es *Botrytis cinerea*, presentando el 75% de afectación en la planta.

Para ver si la capacidad de CDG-17 genera resistencia en la planta para que no vaya a más la enfermedad, se ha hecho también una valoración con las plántulas de pepino del tratamiento T2, donde se encontraban inoculadas con CDG-17 además de *Botrytis cinerea*. La media de todas las plantas ha dado un resultado de 1,38 de severidad, resultando poseer unos síntomas moderados.

3.2.2 Discusión ensayo *in vivo*

Una vez estudiados los resultados de este ensayo, se puede confirmar que la aplicación de CDG-17 reduce la severidad de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* en plántulas de pepino, dando lugar a un porcentaje de severidad de 54% aproximadamente.

Se ha comparado con los resultados de otros autores la capacidad de CDG-17 de otorgar protección no solo en plántulas de pepino contra el ataque del patógeno *Botrytis*. En el estudio de Alonso M, comunicación personal, se ha argumentado la actividad protectora que tiene CDG-17 en plántulas de pimiento infectadas por *Sclerotinia sclerotiorum*, provocando una reducción en la severidad de la enfermedad causada por este patógeno. Otro caso similar, es el que manifiesta Amate C, comunicación personal, en plántulas de pepino infectadas por *Pseudoperonospora cubensis*.

Se da también el caso de otro hongo endófito que actúa positivamente contra el ataque de *Botrytis cinerea*, en el artículo de Oukala et al.,(2021), se ha defendido el estudio de un ensayo *in vivo* en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) inoculadas por el hongo endófito denominado "ALG258". Estas estaban expuestas a *Botrytis cinerea* bajo diferentes condiciones experimentales, el cual también ha resultado ser un ejemplo de resistencia inducida por endófitos, protegiendo a la planta de la infección por este patógeno.

La relación del hongo endófito con la planta huésped se considera beneficiosa. El endófito tiene la capacidad de producir metabolitos bioactivos que, a la vez el huésped utiliza como mecanismo de defensa, lo que se da la supervivencia de ambos organismos (Sánchez et al.,2013).

4. Conclusiones y recomendaciones técnicas



4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES TÉCNICAS

1. La presencia de sal no influye en el crecimiento de *P. infestans* a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30 °C, pero sí en el caso de *P. parasitica* y *P. capsici*, provocando una disminución en su crecimiento conforme aumentan las concentraciones de NaCl.
2. Los patógenos son capaces de desarrollarse en ambientes sometidos a estreses salinos, así como a diferentes temperaturas, aunque se observa un decrecimiento a las dosis máximas ensayadas para *P. infestans*.
3. El hongo endófito septado oscuro CDG17 ha dado lugar a la inhibición del crecimiento micelial de *Phytophthora infestans*, *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*, en las distintas condiciones de sal y temperatura. La mayor inhibición se ha observado a la temperatura de 25°C en un rango de 73,69%, 74,46% y 76,55% para *Phytophthora infestans*, *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*, respectivamente, a las distintas condiciones de sal ensayadas.
4. El ensayo *in vivo* ha mostrado la capacidad de CDG17 de reducir la severidad de la enfermedad de la podredumbre gris en pepino causado por el patógeno *Botrytis cinerea* en un 54%.

Como recomendación técnica destacaría: usar el hongo endófito CDG-17 como bioplaguicida fúngico para el control de los diferentes patógenos estudiados (*P. infestans*, *P. capsici*, *P. parasitica* y *Botrytis cinerea*), ya que, según el análisis de los resultados, el uso de dicho hongo es una gran oportunidad como medida preventiva para reducir las enfermedades causadas por estos patógenos. Y lo más importante, no se hace uso de productos químicos, sino mediante mecanismos no tóxicos y de manera ecológica. También sería de gran utilidad conocer como actúa CDG-17 frente a otros patógenos y así conocer más ampliamente su comportamiento.

5. Competencias integradas en el proyecto



5. COMPETENCIAS INTEGRADAS EN EL PROYECTO

De acuerdo con el anexo III de la normativa del TFG del Grado en Ingeniería Agrícola por la Universidad de Almería, se han adquirido en gran medida de manera directa e indirecta las siguientes competencias a lo largo del desarrollo del presente proyecto:

E-CB01– Capacidad para la resolución de los problemas matemáticos que puedan plantearse en la ingeniería. Aptitud para aplicar los conocimientos sobre: álgebra lineal; geometría; geometría diferencial; cálculo diferencial e integral; ecuaciones diferenciales y en derivadas parciales; métodos numéricos, algorítmica numérica; estadística y optimización.

E-CB03– Conocimientos básicos sobre el uso y programación de los ordenadores, sistemas operativos, bases de datos y programas informáticos con aplicación en ingeniería.

Se han utilizado programas para realizar análisis estadísticos como *StatGraphics*, bases de datos de información online.

E-CB04– Conocimientos básicos de la química general, química orgánica e inorgánica y sus aplicaciones en la ingeniería.

Lo he aplicado en el proyecto en los métodos de antagonismo en método dual en el ensayo *in vitro*.

CTH01 – Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de Tecnología de la Producción Hortofrutícola: Bases y tecnología de la propagación y producción hortícola, frutícola y ornamental. Control de calidad de productos hortofrutícolas. Comercialización. Genética y mejora vegetal.

Lo he aplicado en el proyecto en el ensayo *in vivo*.

CTH05 – Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de Material vegetal: producción, uso y mantenimiento.

E-CB08– Conocimiento de las bases y fundamentos biológicos del ámbito vegetal y animal en la ingeniería.

E-CA01– Capacidad para conocer, comprender y utilizar los principios de: Identificación y caracterización de especies vegetales.

6. Bibliografía y webgrafía



6. Bibliografía y webgrafía

Abd-El-Khair, H., & El-Gamal Nadia, G. (2011). Effects of aqueous extracts of some plant species against *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* in Phaseolus vulgaris plants. *Archives of phytopathology and plant protection*, 44(1), 1-16.

Ab Rahman, S. F. S., Singh, E., Pieterse, C. M., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102-111.

Agrios, GN (2005). *Plant Pathology*. 5 Ed. San Diego - USA. Academic Press. 948

Alor Romero, N. A. (2015). *Caracterización de Phytophthora infestans y mejora genética para la resistencia en patata* (Doctoral dissertation, Universitat de Lleida).

Aragaki, M., & Uchida, J. Y. (2001). Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. *Mycologia*, 93(1), 137-145.

Aristizábal Castillo, N., & Torres G, C. (2015). Caracterización morfológica y molecular de *Phytophthora* en ají (*Capsicum frutescens* var. Tabasco), Valle del Cauca. *Revista de Ciencias*, 19(2), 71-89.

Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I., & Doolittle, W. F. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, 290(5493), 972-977.

Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 11-18.

Bıçıcı, M., & Cinar, A. (1990). A review of *Phytophthora* diseases of different Mediterranean crops in Turkey 1. *EPPO Bulletin*, 20(1), 101-105

Biggs, A. R. (1999). Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. *Plant disease*, 83(11), 1001-1005.

Birch, P. R., & Whisson, S. C. (2001). *Phytophthora infestans* enters the genomics era. *Molecular Plant Pathology*, 2(5), 257-263.

Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S. Y., Geiser, D. M., & Kang, S. (2008). A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 45(3), 266-277.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Bonaldo, S. M., Pascholati, S. F., & Romeiro, R. S. (2005). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. *Piracicaba: FEALQ*, 11-28.

Campanella, V., Ippolito, A., & Nigro, F. (2002). Activity of calcium salts in controlling *Phytophthora* root rot of citrus. *Crop Protection*, 21(9), 751-756.

Carvalho, F. P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental science & policy*, 9(7-8), 685-692.

Cerdá Cerdá, A. (2003). Agricultura eficiente y agricultura eficaz. En: *Mediterráneo y Medio Ambiente*, 219-231.

Chakravarty, I. M., Roy, J. D., & Laha, R. G. (1967). *Handbook of methods of applied statistics (Vol. I)*, John Wiley & Sons, New York.

Chen, Y., & Wang, D. (2005). Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant disease*, 89(12), 1268-1272.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 4951-4959.

Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. American Phytopathological Society.

Cornet, Anna (2021). *Procesamiento de semillas de pepino antes de plantar*. Farmer. Available at: < <https://burea-uinsurance.com/es/procesamiento-de-semillas-de-pepino-antes-de-plantar/> >

Danielsson, J., Reva, O., & Meijer, J. (2007). Protection of oilseed rape (*Brassica napus*) toward fungal pathogens by strains of plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial ecology*, 54(1), 134-140.

De Bary, A. (1876) Investiga la naturaleza del hongo de la papa, *Phytophthora infestans*. *JR Agric. Soc. Engl. Serie*, 2 (12), 239 - 269.

Drenth, A., & Sendall, B. (2001). Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. *Tropical Plant Protection*, 1, 32-33.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Dyer, A., Matusral, M., Drenth, A., Cohen, A., & Splelman, L. (1993). Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant disease*, 77, 653-661.

Ephytia, (2021). *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, (1876): *Mildiu aéreo*. Available at: < <https://ephytia.inra.fr/es/C/5000/Tomate-Phytophthora-infestans-Mildiu-aereo> >

Erwin, D. & Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. Minnesota, USA: APS press.

Ezziyyani, M., Sid Ahmed, A., Pérez, S. M. E., Requena, M. E., & Candela, M. (2006). Control biológico por microorganismos antagonistas. *Revista Horticultura*, 191, 8-15.

Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186-194.

Fisher, R. A. (1925). *Teoría de la estimación estadística*. En: Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society (Vol. 22, No. 5, (700-725). Prensa de la Universidad de Cambridge.

Flier, W. G., Grünwald, N. J., Kroon, L. P., Sturbaum, A. K., Van den Bosch, T. B., Garay-Serrano, E., (...) Turkensteen, L. J. (2003). The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca Valley of central Mexico suggests genetic differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum spp*. *Phytopathology* 93:382-390.

Flier, W. G., Kroon, L. P. N. M., Hermansen, A., van Raaij, H. M. G., Speiser, B., Tamm, L., (...) & Leifert, C. (2007). Genetic structure and pathogenicity of populations of *Phytophthora infestans* from organic potato crops in France, Norway, Switzerland and the United Kingdom. *Plant Pathology*, 56(4), 562-572

Fry, W. (2008). *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular plant pathology*, 9(3), 385-402.

Fry, W., Grünwald, N., & Ocotlán, J. M. (2010). Introducción a los Oomicetes. *Editado por Alberto Valencia. The Plant Health Instructor*.

Galindo, A., & Gallegly, M. E. (1960). The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 50, 123-28.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Gómez, D. E., & Reis, E. M. (2011). Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Química viva*, 10(1), 6-17.

Google Maps, (2021). (online) Available at: < <https://www.google.com/maps/@36.8227622,2.4051534,504a,35y,353h,50.01t/data=!3m1!1e3?hl=es>>

Gottlieb, D. A. V. I. D., & Shaw, P. D. (1970). Mechanism of action of antifungal antibiotics. *Annual review of phytopathology*, 8(1), 371-402.

Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307-319. doi:10.1038/nrmicro1129

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Rodríguez-Kabana, R., & Kloepper, J. W. (1998). Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(7), 925-937.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian journal of microbiology*, 43(10), 895-914.

Hashmi, T. A., Qureshi, R., Tipre, D., & Menon, S. (2020). Investigation of pesticide residues in water, sediments and fish samples from Tapi River, India as a case study and its forensic significance. *Environmental Forensics*, 21(1), 1-10. doi:10.1080/15275922.2019.1693441

Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., & Pegler, D. N. (1996). Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 38(4), 272-272.

Henfling, J. W. (1987). *Late blight of potato: Phytophthora infestans*. Technical Information Bulletin 4. International Potato Center, Lima, Peru, 25.

Infoagro (2018). Manejo del tizón tardío en papa: *Phytophthora infestans*. Available at: < <https://mexico.infoagro.com/manejo-del-tizon-tardio-en-papa-phytophthora-infestans/>>

Intagri. (2018). "Phytophthora infestans", un Hongo Devastador para las Hortalizas. Available at: <

<https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/phytophthora-infestans-un-hongo-devastador-para-las-hortalizas> >

Jumpponen, A. (2001). Dark septate endophytes—are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza*, 11(4), 207-211.

Jumpponen, A. R. I., & Trappe, J. M. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist*, 140(2), 295-310.

Kafaei, R., Arfaeina, H., Savari, A., Mahmoodi, M., Rezaei, M., Rayani, M., (...) & Ramavandi, B. (2020). Organochlorine pesticides contamination in agricultural soils of southern Iran. *Chemosphere*, 240, 124983.

Kamoun, S. (2003). Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic cell*, 2(2), 191-199.

Khan, M.R., & Mohiddin, F.A. (2018). *Trichoderma*: Its Multifarious Utility in Crop Improvement. In *Crop Improvement through Microbial Biotechnology*. 13, 263–291. Elsevier.

Ko, W. H. (1981). Reversible change of mating type in *Phytophthora parasitica*. *Microbiology*, 125(2), 451-454.

Koppert, (2021). *Control de enfermedades-tizón del pimiento*. Available at: <<https://www.koppert.mx/retos/control-de-enfermedades/tizon-del-pimiento/>>

Kroon, L. P., Brouwer, H., de Cock, A. W., & Govers, F. (2012). The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology*, 102(4), 348-364.

Kuč, J. (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 7-12.

Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., & Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular plant pathology*, 13(4), 329-337.

Leonian, L. H. (1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology*, 12(9),401-408.

Levene, H. (1960). *Robust tests for equality of variances*. En: I. Olkin, S.G. Ghurye, W. Hoeffding, W.G. Madow & H.B. Mann (Eds.) Contributions to probability and

statistics. Essays in honor of Harold Hotelling. Stanford University Press, Stanford, Carolina, p. 278–292.

Mandyam, K., & Jumpponen, A. (2005). Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in mycology*, 53, 173-189.

Marin, F., Dianez, F., Santos, M., Carretero, F., Gea, F. J., Castaneda, C., (...) & Yau, J. A. (2014). Control of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora parasitica* on pepper (*Capsicum annuum* L.) with compost teas from different sources, and their effects on plant growth promotion. *Phytopathologia Mediterranea*, 216-228.

Marra, R., Lombardi, N., d'Errico, G., Troisi, J., Scala, G., Vinale, F., (...) & Lorito, M. (2019). Application of *Trichoderma* strains and metabolites enhances soybean productivity and nutrient content. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(7), 1814-1822.

Martínez, C. R. C. (2008). La importancia de la Sanidad Vegetal en la agricultura. El control de los insectos vectores de los virus de los cultivos hortícolas. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (198), 56-58.

Melgarejo, P., Cal, A. D., & M.-Sagasta, E. (1989). Influence of *Penicillium* frequentans and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. *Canadian journal of botany*, 67(1), 83-87.

Mirzaee, H., Shuey, L., & Schenk, P. M. (2015). Transcriptomics of plants interacting with pathogens and beneficial microbes. *Genomics, proteomics and metabolomics in nutraceuticals and functional foods*, 525-536.

Molina, M. C. R., Rodríguez, M. M., Osorio, C. P., Núñez, E. P., Alonso, E. V., Maya, M. D., & Toro, J. P. (2010). *Phytophthora nicotianae*, the causal agent of root and crown rot (Tristeza disease) of red pepper in La Vera region (Cáceres, Spain). *Spanish journal of agricultural research*, (3), 770-774.

Mondino, P., & Vero, S. (2006). Control biológico de patógenos en plantas. *Área Agraria*.

Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Hussaini, K., & Ghasemi-Fasaei, R. (2018). Effects of calcium salts in controlling *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis. *European Journal of Plant Pathology*, 151(2), 475-485.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Ocampo Pazos, M. (2003). *Control biológico de Phytophthora capsici León en pimiento (Capsicum annum)* (No. H20 O23-T). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru). Facultad de Agronomía.

Oukala, N., Pastor-Fernández, J., Sanmartín, N., Aissat, K., & Pastor, V. (2021). Endophytic Bacteria from the Sahara Desert Protect Tomato Plants Against *Botrytis cinerea* Under Different Experimental Conditions. *Current Microbiology*, 78(6), 2367-2379.

Palazón, C., & Palazón, I. (1989). Estudios epidemiológicos sobre la «tristeza» del pimiento en la zona del Valle Medio del Ebro. *Bol. San. Veg. Plagas*, 15, 293-262.

Pell, M., Stenberg, B., & Torstensson, L. (1998). Potential denitrification and nitrification tests for evaluation of pesticide effects in soil. *Ambio*, 24-28.

Phillips, A. J., Anderson, V. L., Robertson, E. J., Secombes, C. J., & Van West, P. (2008). New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in microbiology*, 16(1), 13-19.

Prada, H., Avila, L., Sierra, R., Bernal, A., & Restrepo, S. (2009). Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre el endófito *Diaporthe sp.* aislado de frailejón (*Espeletia sp.*) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(3), 198-201.

Ragsdale, N. N., Hylin, J. W., Sisler, H. D., Witt, J. M., & Alford, H. G. (1991). *Health and environmental factors associated with agricultural use of fungicides*. National Agricultural Pesticide Impact Assessment Program (NAPIAP).

Ramírez, L., Durán, A., & Mora, D. (1998). Combate integrado de la pudrición radical de la papaya (*Phytophthora sp.*) a nivel de vivero. *Agronomía Mesoamericana*, 72-80.

Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H., & Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(25), 11841-11843.

Rundfeldt, C. (Ed.). (2011). *Drug Development: A Case Study Based Insight into Modern Strategies*. BoD—Books on Demand.

Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava,

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146.

Santos, A., & Flores, M. (1995). Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 20(6), 349-352.

Shea, S. R., Gillen, K. J., & Leppard, W. I. (1980). Seasonal variation in population levels of *Phytophthora cinnamomi* Rands in soil in diseased, freely-drained *Eucalyptus marginata* Sm sites in the northern Jarrah forest of South-Western Australia. *Protection Ecology*, 2(2), 135-156.

Shoda, M. (2000). Bacterial control of plant diseases. *Journal of bioscience and bioengineering*, 89(6), 515-521.

Sornakili, A., Thankappan, S., Sridharan, A. P., Nithya, P., & Uthandi, S. (2020). Antagonistic fungal endophytes and their metabolite-mediated interactions against phytopathogens in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 112, 101525.

Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., and Hall, G. S. (1990). *Revised tabular key to the species of Phytophthora*. (No. Ed. 2). CAB-International. 162, 1-28.

Ulhoa, C. J. (1996). Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. In *Actas del V de Simposio de controle biológico, Anais: Conferencias y Palestras, Foz de Iguaçu-arana-Brasil*, 234-238.

Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20.

Vero, S. M., & Mondino, P. (1999). Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticultura internacional*, 7, 1-10.

Vero, S. M., & Mondino, P. (2001). Control biológico postcosecha: medidas para conservar frutas y hortalizas.

Waterhouse, G. M. (1963). Key to the species *Phytophthora* de Bary. In *Mycological paper No.92*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.

Biocontrol del hongo endófito CDG-17 sobre hongos causantes de podredumbres

Waterhouse, G. M., & Waterston, J. M. (1964). *Phytophthora hibernalis*. *P. syringae*. *P. citriophthora*. *P. nicotianae* var. *nicotianae*. *P. nicotianae* var. *parasitica*. *CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria*, (Set 4).

Yuan, Y., Feng, H., Wang, L., Li, Z., Shi, Y., Zhao, L., (...) & Zhu, H. (2017). Potential of endophytic fungi isolated from cotton roots for biological control against verticillium wilt disease. *PLoS One*, 12(1), e0170557.

El uso de plaguicidas en la agricultura está generando un gran impacto tanto a nivel medioambiental, resultando ser tóxico y perjudicial (Hashmi et al., 2019; Kafaei et al., 2020). Es por ello, por lo que la agricultura se orienta hacia la reducción de plaguicidas químicos y la introducción de sistemas sostenibles con el uso de agentes de manejo biológico.

El campo del control biológico en la agricultura presenta un gran interés como medida alternativa para controlar diferentes patógenos vegetales, así como plagas, contribuyendo a generar un sistema de producción de alimentos más respetuoso con el medio ambiente y con la salud humana (Ab Rahman et al., 2018; Haas & Défago, 2005).

La alternativa de usar hongos y bacterias endofíticas para el manejo de diferentes patógenos que afectan a los cultivos puede ser una opción biológica muy importante hoy en día, se da una amplia gama de efectos beneficiosos para las plantas a partir de formulaciones, las cuales contienen mezclas de distintas especies (Khan & Mohiddin, 2018).

The use of pesticides in agriculture is generating a great impact both at an environmental level, turning out to be toxic and harmful (Hashmi et al., 2019; Kafaei et al., 2020). That is why agriculture is oriented towards the reduction of chemical pesticides and the introduction of sustainable systems with the use of biological management agents.

The field of biological control in agriculture is of great interest as an alternative measure to control different plant pathogens as well as pests, helping to generate a food production system that is more respectful of the environment and human health (Ab Rahman et al., 2018; Haas & Défago, 2005).

The alternative of using endophytic fungi and bacteria for the management of different pathogens that affect crops can be a very important biological option today, it gives a wide range of beneficial effects for plants from formulations, which contain mixtures of different species (Khan & Mohiddin, 2018).

