

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología



**Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum*
Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai
frente a diferentes agentes fitopatógenos.
Estudios ecofisiológicos**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Josefa L. Roselló Caselles

Dirigida por:

Dra. Dña. M^a. Pilar Santamarina Siurana

Valencia, 2003

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han hecho posible este trabajo, en especial

A la Dra. Dña. M^a Pilar Santamarina Siurana, directora de este trabajo, por la oportunidad que me ha ofrecido, pero sobre todo por la confianza y amistad que ha surgido entre nosotras durante los años que llevamos trabajando juntas. Espero seguir contando con ella.

A todos “mis hijos” que han realizado su TFC en la Unidad de Biología Vegetal de la E.T.S.E.M. y E., por los buenos momentos que hemos pasado juntos. Gracias a ellos este trabajo ha resultado más agradable.

A la Profesora Dña. Susana Barceló, por sus consejos y comentarios en la elaboración de la parte estadística del trabajo.

A la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) por haberme facilitado las cepas fitopatógenas, sin ellas este trabajo no hubiera sido posible.

Al Departamento de Ecosistemas Agroforestales, en especial a la Dra. Dña. Concepción Jordá Gutiérrez, por admitirme en el Departamento para la lectura y defensa de la Tesis Doctoral.

Y finalmente a Jordi, que ha sabido aguantar mi mal humor, sobre todo en estos últimos meses, por su apoyo y palabras de ánimo en los momentos más difíciles. A mi familia, Pepica, Paqui, Pacos, Inés, y a la de Jordi, por su paciencia y comprensión. Sin ellos posiblemente no estaría escrito este trabajo.

Y como no, a Jordi Jr., que aún no comprende porqué he de pasar tantas horas delante del ordenador para hacer un trabajo, y él sin poder usarlo, o porqué me enfado cuando no me deja trabajar, o porqué Gracias por ser tan buen hijo.

A todos, muchas gracias.

Al Jordi i al Jordiet
A la memòria del meu pare

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los hongos	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Ecología fúngica	3
1.1.2.1. Actividad de agua (a_w)	4
1.1.2.2. Temperatura	5
1.1.2.3. Interacciones fúngicas	5
1.2. El control biológico	7
1.2.1. Los hongos en el control biológico	9
1.2.2. Mecanismos de control	14
1.3. <i>Penicillium oxalicum</i> Currie and Thom	16
1.3.1. Caracteres morfológicos y culturales	16
1.3.2. Enfermedades causadas por <i>Penicillium</i>	17
1.3.2.1. Control de las enfermedades causadas por <i>Penicillium</i>	18
1.3.3. <i>Penicillium oxalicum</i> en el control biológico	19
1.4. <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	21
1.4.1. Caracteres morfológicos y culturales	21
1.4.2. Algunos usos de <i>Trichoderma</i>	23
1.4.3. <i>Trichoderma</i> en el control biológico	25
1.5. <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn.	29
1.5.1. Caracteres morfológicos y culturales	29
1.5.2. Enfermedades causadas por <i>Rhizoctonia</i>	30
1.5.2.1. Control de enfermedades causadas por <i>Rhizoctonia</i>	34
1.6. <i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	36
1.6.1. Caracteres morfológicos y culturales	36
1.6.2. Enfermedades causadas por <i>Fusarium</i>	38
1.6.2.1. Control de enfermedades causadas por <i>Fusarium</i>	44
1.7 <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	47
1.7.1. Caracteres morfológicos y culturales	47
1.7.2. Enfermedades causadas por <i>Verticillium</i>	48

1.7.2.1. Control de enfermedades causadas por <i>Verticillium</i>	51
2. OBJETIVOS	53
3. PLAN DE TRABAJO	55
4. MATERIAL Y MÉTODOS	58
4.1. Material	58
4.1.1. Microorganismos	58
4.2. Métodos	59
4.2.1. Medios de cultivo	59
4.2.1.1. Medio PDA (agar patata glucosada)	59
4.2.1.2. Extracto de patata (EP)	60
4.2.1.3. Medio PDA con la actividad de agua (a_w) modificada con glicerol	60
4.2.2. Condiciones del experimento	62
4.2.3. Estudio de la influencia de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento de las colonias	64
4.2.4. Estudio del Tipo de Interacción e Índice de Dominancia en las interacciones fúngicas	64
4.2.5. Estudio estadístico	66
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
5.1. Efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de las cepas estudiadas individualmente	67
5.1.1. <i>Penicillium oxalicum</i> LBVB 1001	68
5.1.2. <i>Trichoderma harzianum</i> LBVB 1010	73
5.1.3. <i>Rhizoctonia solani</i> CECT 2819	77
5.1.4. <i>Fusarium oxysporum</i>	81
5.1.4.1. <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> CECT 2715 y 2866	81
5.1.4.2. <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i> CECT 2867 y 2868	88
5.1.5. <i>Verticillium dahliae</i> CECT 2694	94
5.2. Efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de las cepas estudiadas en las interacciones fúngicas	98

5.2.1.	Interacción <i>Penicillium oxalicum</i> LBVB 1001 - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> CECT 2715	98
5.2.2.	Interacción <i>Penicillium oxalicum</i> LBVB 1001 - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> CECT 2866	107
5.2.3.	Interacción <i>Penicillium oxalicum</i> LBVB 1001 - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i> CECT 2867	115
5.2.4.	Interacción <i>Penicillium oxalicum</i> LBVB 1001 - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i> CECT 2868	123
5.2.5.	Interacción <i>Trichoderma harzianum</i> LBVB 1010 – <i>Rhizoctonia solani</i> CECT 2819	131
5.2.6.	Interacción <i>Trichoderma harzianum</i> LBVB 1010 – <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> CECT 2715	139
5.2.7.	Interacción <i>Trichoderma harzianum</i> LBVB 1010 – <i>Verticillium dahliae</i> CECT 2694	148
5.3.	Estudio del Tipo de Interacción e Índice de Dominancia en las interacciones fúngicas	156
5.3.1.	Interacción <i>Penicillium oxalicum</i> LBVB 1001 - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> CECT 2715	157
5.3.2.	Interacción <i>Penicillium oxalicum</i> LBVB 1001 - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> CECT 2866	164
5.3.3.	Interacción <i>Penicillium oxalicum</i> LBVB 1001 - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i> CECT 2867	170
5.3.4.	Interacción <i>Penicillium oxalicum</i> LBVB 1001 - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i> CECT 2868	176
5.3.5.	Interacción <i>Trichoderma harzianum</i> LBVB 1010 – <i>Rhizoctonia solani</i> CECT 2819	182
5.3.6.	Interacción <i>Trichoderma harzianum</i> LBVB 1010 - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> CECT 2715	188
5.3.7.	Interacción <i>Trichoderma harzianum</i> LBVB 1010 – <i>Verticillium dahliae</i> CECT 2694	194

6. CONCLUSIONES	200
7. PERSPECTIVAS DE FUTURO	205
8. BIBLIOGRAFÍA	207
ANEXO A	221
ANEXO B	229
ANEXO C	237

RESUM

En l'actualitat, l'ús de plaguicides químics encara resulta necessari per a controlar i incrementar els rendiments agrícoles, però en els últims anys l'ús abusiu d'aquests productes ha desencadenat una sèrie d'alteracions mediambientals, que han influït en la degradació del sòl, la pèrdua de biodiversitat, i l'augment de les malalties que ataquen els conreus a causa del desenvolupament d'espècies resistents als plaguicides.

A més a més, els consumidors estan preocupant-se cada vegada més pels efectes directes, indirectes i acumulatius que els plaguicides tenen sobre la qualitat dels aliments, la salut i el medi natural. Per això, hi ha un consens cada vegada major, per part de la comunitat científica, que els mètodes de cultiu basats en l'ús de productes químics de síntesi són insostenibles, i com a resultat d'això s'estan investigant nous sistemes més ecològics per a la protecció dels conreus. La concepció actual del control de les malalties es basa en la integració compatible, racional i sostenible de tots els sistemes de control disponibles (control cultural, control químic i control biològic). Aquests sistemes de control perseguixen reduir de mode important la dependència dels plaguicides químics, i per a això es recolza en la utilització dels mètodes de control biològic i en els mecanismes de defensa de les plantes. L'esforç que la investigació els dedica s'ha incrementat de manera espectacular, i això s'ha començat a reflectir en el nombre d'agents de biocontrol disponibles en el mercat o en fase d'estudi.

Davant de la necessitat de trobar nous mètodes que substituïsquen els productes químics per al control de plagues i malalties dels conreus, una alternativa seria aprofitar els avantatges que ofereixen els fongs com a agents de biocontrol davant d'altres mètodes de lluita, bé per ells mateixos o mitjançant els seus compostos metabòlics. D'altra banda, està reconegut que el control biològic es produeix de forma natural sense intervenció de l'home, ja que les plagues tenen els seus antagonistes naturals. Per això, si es coneixen els mecanismes d'interacció entre un patògen i els organismes antagònics, el control biològic pot mantindre l'equilibri entre les poblacions. Els organismes dificulten l'activitat patogènica d'altres utilitzant una gran varietat de mecanismes d'acció com, l'antibiosi, la competència pels nutrients i l'espai, i el parasitisme. En ocasions, no és fàcil determinar amb precisió els mecanismes que intervenen en les

interaccions entre antagonistes i patògens, però en general, no tenen un únic tipus d'acció, i si l'antagonista en posseeix diversos redueix el risc que el patogen desenvolupi sistemes de resistència; per això posseir distints mecanismes els converteix en possibles agents de biocontrol.

Entre les espècies fúngiques amb major potencial per al control de les malalties de les plantes, cal destacar els gèneres *Penicillium* i *Trichoderma*. L'espècie *P. oxalicum* ha demostrat ser activa davant de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, que causa la fusariosi de la tomaca, i quant a *Trichoderma*, diversos autors han referenciat el comportament antagònic de *T. harzianum* davant d'altres fongs patògens de plantes, mitjançant el micoparasitisme com a principal mecanisme d'acció.

Aquest treball té com a objectiu l'obtenció d'un organisme d'interès per al desenvolupament d'una agricultura més respectuosa amb el medi ambient, capaç de controlar als agents patògens que causen malalties en els conreus. I per a aconseguir-los ens vam proposar estudiar “*in vitro*” el comportament de les soques *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 i *Trichoderma harzianum* LBVB 1010, a fi d'avaluar la seua capacitat per a competir i dominar en determinades condicions ambientals d'activitat d'aigua (a_w) i temperatura (T), quan s'enfronten a distintes soques fitopatògenes: *Rhizoctonia solani* CECT 2819, *Verticillium dahliae* CECT 2694, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715 i CECT 2866, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* CECT 2867 i CECT 2868.

En primer lloc es va estudiar la resposta de les soques fúngiques als factors ecofisiològics en cultiu individual. Posteriorment, en assajos de creixement dual, es va avaluar la influència d'aquests factors enfrontant *P. oxalicum* amb les quatre soques de *F. oxysporum*, així com *T. harzianum* davant de *R. solani*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715 i *V. dahliae*. A més a més, basant-nos en el Tipus d'Interacció que estableixen les espècies enfrontades en les interaccions interespecífiques, es va calcular l'Índex de Dominància (I_D) per a cada una d'elles. Finalment, els resultats obtinguts ens van permetre determinar la capacitat antagonista de les soques *P. oxalicum* i *T. harzianum* davant dels agents fitopatògens estudiats.

Els resultats de l'estudi individual de les soques objecte d'aquest treball, a les a_w (0.85, 0.90, 0.95, 0.98 i 0.995) i T (15 i 25°C) assajades, posen de manifest que es produeix un increment en les ràtios de creixement a mesura que la disponibilitat d'aigua

del medi augmenta, situant-se el valor màxim de creixement quan l' a_w també és màxima (0.995). No obstant això, en la soca *P. oxalicum*, les ràtios s'incrementen a mesura que augmenta l' a_w fins a 0.98, on obté l'òptim de creixement, però posteriorment aquest experimenta un descens quan l' a_w ascendix a 0.995. En totes les soques assajats, s'observa una variació de les taxes de creixement amb la temperatura, sent la disminució de la temperatura, de 25 a 15°C, la que ocasiona el descens del creixement fúngic. Cal destacar que la soca *V. dahliae* s'ha caracteritzat per presentar els valors de creixement més baixos de totes les soques analitzades, per una altra banda *T. harzianum* ha sigut la que majors ràtios ha aconseguit.

La soca *P. oxalicum*, en les interaccions amb les distintes soques de *F. oxysporum*, obté majors taxes de creixement quan a 25°C l' a_w és igual o menor que 0.98. Quan la temperatura és de 15°C, *P. oxalicum* arriba a situar-se per damunt de la soca 2715 i 2867 de *F. oxysporum* si l' a_w és igual o menor que 0.95 i que 0.90, respectivament. No obstant això, a 15°C y a l' a_w de 0.95, no s'aprecien pràcticament diferències en les ràtios de creixement entre *P. oxalicum* i les soques 2866 i 2868 de *F. oxysporum*.

La soca *T. harzianum* va presentar en els assajos de creixement dual davant de *R. solani* i *V. dahliae*, tant a 15 com a 25°C, majors valors de creixement per a aquelles a_w en què ambdues soques de la interacció creixen en comú (0.98 i 0.995), posant de manifest el total predomini de *T. harzianum* sobre les soques enfrontades. En la interacció entre *T. harzianum* i la soca de *F. oxysporum* 2715, també és *T. harzianum* la que obté ràtios de creixement majors en quasi totes les condicions assajades en les que mostren creixement, excepte a l' a_w de 0.95 i 15°C, on no s'observen diferències entre els valors de creixement de les soques.

El Tipus d'Interacció que s'origina entre *P. oxalicum* i les distintes soques de *F. oxysporum*, així com l'Índex de Dominància obtingut per a cada una d'elles, posen de manifest que, quan les condicions d' a_w no superen el valor de 0.95 a 25°C, la soca *P. oxalicum* és capaç d'inhibir, a distància (valor 5) o per contacte (valor 4), els seus creixements, i aconseguint valors màxims de I_D . Posteriorment, *P. oxalicum* va continuar creixent per damunt de les colònies inhibides. A més a més, aquests dos paràmetres ens demostren també el total predomini de *T. harzianum* sobre *R. solani*, *V. dahliae* i *F. oxysporum* 2715, inhibint per contacte (valor 4) el creixement d'aquestes,

quan en ambdues temperatures l' a_w està compresa entre 0.95 i 0.995, excepte en la interacció amb *Fusarium*, que a 15°C i per a una a_w de 0.95, ambdues soques estableixen un antagonisme mutu per contacte, sense predomini d'una sobre l'altra, i sent l' I_D (valor 2) el mateix per a ambdues espècies.

Els resultats obtinguts ens permeten concloure que la soca *T. harzianum* presenta una extraordinària capacitat d'antagonisme davant de *R. solani*, *V. dahliae* i FOL1 en totes les condicions assajades, per la qual cosa pot ser considerada com un bon agent de biocontrol.

La soca *P. oxalicum* no presenta uns resultats tan espectaculars com *T. harzianum*, però no per això, menys interessants. Aquesta soca ens aporta dades molt útils en mostrar major poder de competència quan les condicions d' a_w no són òptimes per al seu creixement, demostrant que la competitivitat entre les espècies no està relacionada amb el creixement. Aquesta circumstància és la que li permetrà controlar a les soques de *F. oxysporum* estudiades, quedant demostrada la seua capacitat antagònica davant d'aquestes i el seu paper com a agent de biocontrol.

RESUMEN

En la actualidad, el uso de plaguicidas químicos aún resulta necesario para controlar e incrementar los rendimientos agrícolas, pero en los últimos años el uso abusivo de estos productos ha desencadenado una serie de alteraciones medioambientales, que han influido en el deterioro del suelo, la pérdida de biodiversidad, y el aumento de las enfermedades que atacan a los cultivos debido al desarrollo de especies resistentes a los plaguicidas.

Además, los consumidores están preocupándose cada vez más por los efectos directos, indirectos y acumulativos que los plaguicidas tienen sobre la calidad de los alimentos, la salud y el medio natural. Por ello, existe un consenso cada vez mayor, por parte de la comunidad científica, de que los métodos de cultivo basados en el uso de productos químicos de síntesis son insostenibles, y como resultado de ello se están investigando nuevos sistemas más ecológicos para la protección de los cultivos. La concepción actual del control de las enfermedades se basa en la integración compatible, racional y sostenible de todos los sistemas de control disponibles (control cultural, control químico y control biológico). Estos sistemas de control persiguen reducir de modo importante la dependencia de los plaguicidas químicos, y para ello se apoya en la utilización de los métodos de control biológico y en los mecanismos de defensa de las plantas. El esfuerzo que la investigación les dedica se ha incrementado de manera espectacular, y eso se ha empezado a reflejar en el número de agentes de biocontrol disponibles en el mercado o en fase de estudio.

Ante la necesidad de encontrar nuevos métodos que sustituyan a los productos químicos para el control de plagas y enfermedades de los cultivos, una alternativa sería aprovechar las ventajas que ofrecen los hongos como agentes de biocontrol frente a otros sistemas de lucha, bien por ellos mismos o a través de sus metabólicos fúngicos. Por otra parte, está reconocido que el control biológico se produce de forma natural sin intervención del hombre, puesto que las plagas tienen sus antagonistas naturales. Por ello, si se conocen los mecanismos de interacción entre un patógeno y los organismos antagónicos, el control biológico puede mantener el equilibrio entre las poblaciones. Los organismos dificultan la actividad patogénica de otros utilizando una gran variedad de mecanismos de acción como, la antibiosis, la competencia por los nutrientes y el

espacio, y el parasitismo. En ocasiones, no es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre antagonistas y patógenos, pero en general, no tienen un único tipo de acción, y sí el antagonista posee varios de ellos reduce el riesgo de que el patógeno desarrolle sistemas de resistencia; por ello poseer distintos mecanismos les convierte en posibles agentes de biocontrol.

Entre las especies fúngicas con mayor potencial para el control de las enfermedades de las plantas, cabe destacar a los géneros *Penicillium* y *Trichoderma*. La especie *P. oxalicum* ha demostrado ser activa frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, que causa la fusariosis del tomate, y en cuanto a *Trichoderma*, diversos autores han referenciado el comportamiento antagonista de *T. harzianum* frente a otros hongos patógenos de plantas, a través del micoparasitismo como principal mecanismo de acción.

Este trabajo tiene como objetivo la obtención de un organismo de interés para el desarrollo de una agricultura más respetuosa con el medio ambiente, capaz de controlar a los agentes patógenos que causan enfermedades en los cultivos. Y para conseguirlo nos propusimos estudiar “*in vitro*” el comportamiento de las cepas *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 y *Trichoderma harzianum* LBVB 1010, con el fin de evaluar su capacidad para competir y dominar bajo determinadas condiciones ambientales de actividad de agua (a_w) y temperatura (T), cuando se enfrentan a distintas cepas fitopatógenas: *Rhizoctonia solani* CECT 2819, *Verticillium dahliae* CECT 2694, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715 y CECT 2866, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* CECT 2867 y CECT 2868.

En primer lugar se estudió la respuesta de las cepas fúngicas a los factores ecofisiológicos en cultivo individual. Posteriormente, en ensayos de crecimiento dual, se evaluó la influencia de dichos factores enfrentando *P. oxalicum* con las cuatro cepas de *F. oxysporum*, así como *T. harzianum* frente a *R. solani*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715 y *V. dahliae*. Además, basándonos en el Tipo de Interacción que establecen las especies enfrentadas en las interacciones interespecíficas, se calculó el Índice de Dominancia (I_D) para cada una de ellas. Finalmente, los resultados obtenidos nos permitieron determinar la capacidad antagonista de las cepas *P. oxalicum* y *T. harzianum* frente a los agentes fitopatógenos estudiados.

Los resultados del estudio individual de las cepas objeto de este trabajo, a las a_w (0.85, 0.90, 0.95, 0.98 y 0.995) y T (15 y 25°C) ensayadas, ponen de manifiesto que se produce un incremento en las ratios de crecimiento a medida que la disponibilidad de agua del medio aumenta, situándose el valor máximo de crecimiento cuando la a_w también es máxima (0.995). Sin embargo, en la cepa *P. oxalicum*, las ratios se incrementan al aumentar la a_w hasta 0.98, donde obtiene el óptimo de crecimiento, pero posteriormente éste experimenta un descenso cuando la a_w asciende a 0.995. En todas las cepas ensayadas, se observa una variación de las tasas de crecimiento con la temperatura, siendo la disminución de la temperatura, de 25 a 15°C, la que ocasiona el descenso del crecimiento fúngico. Destacar que la cepa *V. dahliae* se ha caracterizado por presentar los valores de crecimiento más bajos de todas las cepas analizadas, por el contrario *T. harzianum* ha sido la que mayores ratios ha alcanzado.

La cepa *P. oxalicum*, en las interacciones con las cepas de *F. oxysporum*, obtiene tasas de crecimiento más altas cuando a 25°C la a_w es igual o menor que 0.98. A la temperatura de 15°C, *P. oxalicum* es capaz de superar el crecimiento de la cepa 2715 y 2867 de *F. oxysporum* si la a_w es igual o menor que 0.95 y que 0.90, respectivamente. Sin embargo, a 15°C y a la a_w de 0.95, no se aprecian prácticamente diferencias en las ratios de crecimiento entre *P. oxalicum* y las cepas 2866 y 2868 de *F. oxysporum*.

La cepa *T. harzianum* presenta en los ensayos de crecimiento dual frente a *R. solani* y *V. dahliae*, tanto a 15 como a 25°C, mayores valores de crecimiento para aquellas a_w en las que las cepas de la interacción crecen en común (0.98 y 0.995), quedando de manifiesto el total predominio de *T. harzianum* sobre las cepas enfrentadas. En la interacción entre *T. harzianum* y la cepa 2715 de *F. oxysporum*, también es *T. harzianum* la que obtiene ratios de crecimiento mayores en casi todas las condiciones ensayadas en las que muestran crecimiento, excepto a la a_w de 0.95 y 15°C, donde no se observan diferencias entre los valores de crecimiento de las cepas.

El Tipo de Interacción que se origina entre *P. oxalicum* y las cepas de *F. oxysporum*, así como el Índice de Dominancia obtenido para cada una de ellas, ponen de manifiesto que, cuando las condiciones de a_w no superen el valor de 0.95 a 25°C, la cepa *P. oxalicum* es capaz de inhibir, a distancia o por contacto el crecimiento de las mismas, correspondiéndole valores máximos de de I_D (5 y 4, respectivamente) y con posterior crecimiento a través de sus colonias. Además, ambos parámetros nos demuestran

también el total predominio de *T. harzianum* sobre *R. solani*, *V. dahliae* y *F. oxysporum* cepa 2715, inhibiendo por contacto (I_D de 4) sus crecimientos, cuando en ambas temperaturas la a_w está comprendida entre 0.95 y 0.995, excepto frente a la cepa de *Fusarium*, que a 15°C y para una a_w de 0.95, ambas especies establecen antagonismo mutuo por contacto, sin predominio de una sobre la otra, y siendo el I_D (valor 2) el mismo para las dos.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la cepa *T. harzianum* presenta una extraordinaria capacidad antagónica frente a *R. solani*, *V. dahliae* y *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* cepa 2715, por lo que puede ser considerado como un buen agente de biocontrol.

La cepa *P. oxalicum* no presenta unos resultados tan espectaculares como *T. harzianum*, pero no por ello, menos interesantes. Esta cepa nos aporta datos muy útiles al mostrar mayor poder de competencia cuando las condiciones de a_w no son las óptimas para su crecimiento, demostrando que la competitividad entre las especies no está relacionada con el crecimiento. Esta circunstancia es la que le permitirá controlar a las cepas de *F. oxysporum* estudiadas, quedando demostrada también su capacidad antagónica frente a las mismas y su papel como agente de biocontrol.

SUMMARY

At present, the use of chemical pesticides is still necessary to control and increase the agricultural yields, although in the last years the abusive use of these products has caused a series of environmental alterations, which have influenced the deterioration of soil, the loss of biodiversity, and the increase in the number of diseases that attack the crops, due to the development of species resistant to the pesticides.

The consumers, too, are more and more concerned about the direct, indirect and accumulative effects that pesticides have on the quality of food, health and the environment. Thus, there is a solid agreement within the scientific community about the cultivation methods based on the use of chemical synthetic products, which become unacceptable, and, consequently, new systems more ecological for the protection of the crops are being researched. The present approach to the control of diseases is based on the compatible, rational and sustainable integration of all the available control systems (cultivation control, chemical control and biological control). These control systems seek to reduce the dependence on the chemical pesticides considerably, and they are based on the use of biological control methods and the mechanisms of protection of plants. The research resources in this field are increasing in a spectacular way, and it is reflected in the number of available biocontrol agents in the market or those being studied.

Due to the need to find new methods that substitute the chemical products for the blight control and cultivation diseases, the use of fungi as biocontrol agents, compared to other control systems, either by themselves or by their metabolic compounds, would be an interesting alternative. On the other hand, the biological control takes place in a natural way without man's control, since blights have their natural antagonists. Thus, if the interaction mechanisms between a pathogen and its antagonistic organisms are known, the biological control could keep the balance among the populations. Some organisms hinder the pathogenic activity of other organisms using a wide variety of action mechanisms, such as the antibiosis, the competition for the nutrients and the space, and the parasitism. Sometimes, it is not easy to determine, accurately, the interaction mechanisms between antagonistic fungi and pathogens, although, in general, there is not a unique action type. Moreover, if the antagonist

presents several of them, the risk that the pathogen develops resistance systems becomes reduced. Thus, when the antagonist presents different mechanisms, there are more possibilities for its use as a biocontrol agent.

Out of fungic species with more potential for the control of plant diseases, *Penicillium* and *Trichoderma* genera are outstanding. *P. oxalicum* species is active compared to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, which causes the fusariosis of the tomato, and as regards *Trichoderma*, it has already reported the antagonistic behaviour of *T. harzianum* compared to other pathogenic fungi of plants, being the micoparasitism its main action mechanism.

The aim of this doctoral dissertation was to obtain an efficient organism for the development of a environment-friendly agriculture, able to control pathogen agents that cause diseases in the cultivations. A study *in vitro* was carried out in order to achieve this goal, about the behaviour of *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 and *Trichoderma harzianum* LBVB 1010 strains, evaluating their capacity to compete and to dominate under determined environmental conditions of water activity (a_w) and temperature (T), when they meet some different phytopathogenic strains: *Rhizoctonia solani* CECT 2819, *Verticillium dahliae* CECT 2694, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715 and CECT 2866, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* CECT 2867 and CECT 2868.

In the first place, the behaviour of single growing fungic strains as regards the environmental factors was studied. Next, for dual growth experiments, the influence of these environmental factors was evaluated when *P. oxalicum* interacted with the four different strains of *F. oxysporum*, as *T. harzianum* interacted with *R. solani*, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715 and *V. dahliae*. Also, according to the type of interaction found for species studied in the interspecific interactions, the Index of Dominance (I_D) values for each one of the tested strains in this study were calculated. Finally, the results obtained allowed us to determine the antagonistic capacity of the *P. oxalicum* and *T. harzianum* strains as opposed to the studied phytopathogenic agents.

The results obtained from the single growth experiment for all the studied strains, at different a_w (0.85, 0.90, 0.95, 0.98 and 0.995) and T (15 and 25°C) conditions, revealed that an increase in the growth rate takes place when water availability of the medium increases, being established the maximum value of growth rate for the highest a_w value (0.995). However, for *P. oxalicum* strain, the growth rate increases as a_w

increases, too, up to 0.98, where optimum growth is obtained, and a decrease for higher a_w values (0.995) is observed. In all cases, a decrease in the growth rate was observed when temperature was lowered from 25 to 15°C. It can be noticed that *V. dahliae* strain behaviour showed lowest growth rate values, whereas *T. harzianum* reached the highest ones.

For *P. oxalicum* strain, when interacting with different *F. oxysporum* strains, higher growth rates were obtained when, at 25°C, a_w was equal to or lower than 0.98. At 15°C experiments, *P. oxalicum* yielded higher growth rate than *F. oxysporum* 2715 and 2867 when a_w was lower or equal to 0.95 and 0.90, respectively. However, at 15°C, no significant differences in growth rate were observed when *P. oxalicum* interacted with *F. oxysporum* 2866 and 2868.

The *T. harzianum* strain presented in the dual growth experiments compared to *R. solani* and *V. dahliae*, for both 15 and 25°C, higher growth rate values for those a_w in which both strains showed growth (0.98 and 0.995), suggesting the total predominance of *T. harzianum* on the testing strains. For the interaction between *T. harzianum* and *F. oxysporum* 2715, *T. harzianum* also showed higher growth rates in the testing experimental conditions, except when a_w was 0.95 at 15°C, where no significant differences were observed for both growth rate values.

The Type of Interaction found between *P. oxalicum* and the different strains of *F. oxysporum*, as well as the Index of Dominance obtained for each one of them, showed that, when the a_w value was not higher than 0.95 at 25°C, the *P. oxalicum* strain would be able to inhibit the growth of those ones, by dominance at a distance (value of 5) or on contact (value of 4), showing further growing over the inhibited colonies. Moreover, both parameters demonstrated the total predominance of *T. harzianum* on *R. solani*, *V. dahliae* and *F. oxysporum* 2715, inhibiting the growth of those by dominance on contact (value of 4), when, for both temperatures, a_w was in the 0.95-0.995 range, except as opposed to *F. oxysporum* strain, when they interacted at 15°C for a_w of 0.95, in which both strains established a mutual antagonism on contact, without predominance of any species, and being the I_D (value of 2) the same one for both of them.

The results obtained allow us to conclude that the *T. harzianum* strain presents an extraordinary antagonistic capacity compared to *R. solani*, *V. dahliae* and *F.*

oxysporum 2715 under all the testing conditions, and, consequently, *T. harzianum* could be considered as a very good biocontrol agent.

The results obtained using *P. oxalicum* strains were not as spectacular as the ones found for *T. harzianum*, though they were also interesting. This strain brings forward very useful data, because it showed higher competitiveness when a_w conditions are not optimum for its growth, suggesting that the competitiveness between species is not related to growth. This circumstance is the one that will allow *P. oxalicum* strains to control the studied *F. oxysporum* strains, and its antagonistic capacity against them and its role as biocontrol agent has been clearly demonstrated.

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. Los hongos

1.1.1.- Generalidades

Los hongos son organismos eucarióticos que se reproducen por medio de esporas. Todos los hongos son heterótrofos y precisan compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono. Son aerobios o anaerobios facultativos, y la mayoría de ellos viven como saprofitos en el suelo y el agua. Los hongos, junto con otros microorganismos contribuyen, de forma significativa a la descomposición de la materia orgánica y al reciclado de los nutrientes. Así convierten los materiales muertos de origen vegetal y animal en compuestos que pueden ser utilizados por las plantas, por ello sus actividades son tan necesarias para que continúe la vida, como lo son las actividades de los productores de alimento.

Se han descrito unas 100.000 especies fúngicas, y de ellas sólo unas 100 son patógenas para el hombre y animales. En cambio aproximadamente unas 5.000 son patógenas de plantas; prácticamente cada planta de importancia económica es atacada por uno o varios hongos.

Los hongos, como descomponedores que son, a veces, entran en conflicto con los intereses humanos al producir efectos indeseables en la industria o la agricultura. Por ello, no tienen buena prensa y la gente los percibe como organismos dañinos que estropean los alimentos, que causan enfermedades en los cultivos agrícolas y ornamentales, que deterioran las estructuras de las casas y edificios, y que ocasionan infecciones en los humanos y animales. En general, los hongos son considerados como competidores de las actividades humanas, puesto que debido a su adaptabilidad nutricional no saben discernir los sustratos que colonizan y atacan tanto a un árbol que ha caído en el bosque como a un poste de luz, etc.

La capacidad que tienen los hongos para crecer en una gama tan amplia de condiciones realza su importancia como plagas de los cultivos; pero las mismas

cualidades que los convierten en plagas son las que los hacen apreciables en términos económicos. Por ello, y aunque los hongos son perjudiciales para la economía humana, sus actividades beneficiosas sobrepasan con creces su impacto negativo.

Tradicionalmente el hombre ha empleado a los hongos para la elaboración de alimentos como el pan y el queso, y desde la antigüedad son utilizados para la fermentación de bebidas alcohólicas, incluyendo vino, cerveza y licores. Del mismo modo, las setas y el hombre tienen una larga historia en común, como alimento o como arma mortífera, y el cultivo de las mismas es actualmente de un gran interés económico. Otras aplicaciones de los hongos en la industria alimentaria son la producción de agentes saborizantes, colorantes, conservantes y como complemento proteico.

Otros usos de la micología aplicada (biotecnología de los hongos) es la producción industrial de productos bioquímicos como los ácidos orgánicos (ácido cítrico, fumárico, láctico e itacónico) y los fitorreguladores (giberelinas), así como los antibióticos naturales y semisintéticos (penicilina, estreptomicina, cefalosporina, griseofulvina, amoxicilina, etc.). También resaltar el avance que ha supuesto en el campo de la medicina el descubrimiento de los agentes antitumorales o inmunosupresores como la ciclosporina, que previene el rechazo en los trasplantes de órganos.

Estudios más recientes han demostrado la existencia de nuevos usos industriales para los hongos, como su aplicación en la solubilización del carbón, en la deslignificación de la pulpa de papel, y en la eliminación de iones metálicos y partículas insolubles de las soluciones.

También la aplicación de los hongos en la agricultura ha permitido obtener importantes avances, aunque parezca contradictorio. Por una parte, están los hongos micorrícicos que, gracias a la asociación de simbiosis mutualista que establecen con las raíces de las plantas, desempeñan un papel crucial en el desarrollo de los vegetales, favoreciendo la absorción de los nutrientes del suelo por parte de las plantas, sobre todo en suelos carentes de ellos.

Los hongos no simbióticos también son interesantes para estimular la liberación de nutrientes a partir de fertilizantes, que por otra parte son insolubles, para que sean aprovechados por las plantas; por ejemplo, los hongos que oxidan sulfuros y solubilizan sulfatos pueden ser aplicados como inoculantes de suelos de forma que aumenten la disponibilidad de sulfuros y fósforo (Wainwright, 1995).

Por otra parte, cada vez son más los trabajos que demuestran la eficacia de los hongos como agentes de biocontrol, al ser capaces de reducir las poblaciones de hongos, bacterias e insectos que causan enfermedades en los cultivos, y por consiguiente importantes pérdidas económicas en la agricultura (Alfonso y col., 1992; Altomare y Bottalico, 1992; Bunker y Mathur, 2001; Callan y col., 1996; De Cal y col., 1995, 1997a, 1999, 2000; Fernández-Larrea, 2001; Latorre y col., 1997; Marín y col., 1998 b; Pandey y col., 1993; Papaviza, 1985; Sandoval y Sáenz, 1992; Santamarina y col., 1987, 2000; Stirmanova, 1994; Windels y Comedla, 1978). Actualmente, productos obtenidos a partir de diversos hongos están siendo utilizados como plaguicidas en la protección de los cultivos (Yamaguchi, 1992).

El uso de los hongos en el control de las plagas es muy atractivo debido a que proporciona una alternativa a los productos químicos de síntesis, los cuales están siendo considerados cada vez más como dañinos para el medio ambiente y la salud de los consumidores.

Todos estos logros ponen de manifiesto el gran potencial que presentan los hongos con fines beneficiosos para el hombre, y seguramente ningún otro grupo de organismos está, de forma tan variada, asociado a los seres humanos como lo están los hongos.

1.1.2.- Ecología fúngica

En la naturaleza ningún organismo que viva en una comunidad existe de forma aislada. Cada organismo interviene en toda una serie de interacciones, tanto con otros organismos como con los factores del ambiente que lo rodean. Por ello, el crecimiento y desarrollo de los hongos se ve influenciado por los factores bióticos (interacciones con

hongos y otros organismos) y por los factores abióticos, como la actividad de agua, la temperatura, la composición gaseosa y el pH del sustrato.

Entre los factores ambientales muestran especial importancia la actividad de agua y la temperatura, puesto que influyen en la capacidad de los hongos para usar los nutrientes del suelo y para crecer en ellos (Griffin, 1981, Magan y Lacey, 1984). La temperatura afecta al crecimiento del micelio y a la germinación de los conidios, mientras que la disponibilidad de agua determina si una espora fúngica puede germinar y con qué rapidez lo hace (Lacey y Magan, 1991).

Existe poca información disponible sobre los requerimientos nutricionales y ambientales de la mayoría de los hongos, por lo que el conocimiento de los mismos es necesario para comprender la eficacia de los hongos en el control biológico.

1.1.2.1.- Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua (a_w) es una de las tres medidas que se utilizan en microbiología para expresar la disponibilidad de agua. Fue introducida por Scott en 1957 cuando demostró que cuantificaba la relación de humedad entre un sustrato y la capacidad de los microorganismos para desarrollarse en él. Este parámetro fisicoquímico se define como el cociente entre la presión de vapor del agua que hay en un sustrato y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura y presión (Lacey y Magan, 1991).

La actividad fúngica depende estrechamente de la disponibilidad de agua del medio, conforme ésta aumenta, un mayor número de hongos pueden crecer, y son prácticamente los únicos microorganismos capaces de desarrollarse en valores inferiores a 0.85 de a_w (Mossel, 1985), así como presentar el mayor intervalo de a_w donde poder crecer.

Cuando la a_w disminuye por debajo del óptimo de crecimiento se reduce la velocidad de crecimiento y se retrasa la germinación de las esporas. Generalmente, los valores de a_w para que germinen las esporas son ligeramente menores que los del

crecimiento miceliar. Este crecimiento miceliar suele ser anormal cerca de los límites de a_w para la germinación, con hinchamiento de los tubos germinales, contracción de las células de los mismos, e hifas malformadas y con septos cortos (Magan y Lacey, 1984; Marín y col., 1998 b).

Los requerimientos de a_w se han usado como método de diferenciación entre las especies fúngicas. Pelhate (1968) clasificó a los hongos basándose en su habilidad para crecer a las distintas a_w en: xerofílicos a 0.95, mesofílicos entre 0.95-1.00, e higrofilicos a 1.00 de a_w .

1.1.2.2.- Temperatura

La temperatura influye notablemente en el crecimiento fúngico y en la formación y germinación de los conidios. La mayoría de los hongos crecen entre 10-40°C y tienen su óptimo de crecimiento alrededor de los 25 y 30°C. Los hongos pueden soportar temperaturas extremas y, aunque no pueden crecer, sus conidios se mantienen viables y germinarán cuando se recuperen las condiciones normales. El descenso de la temperatura provoca una ralentización del metabolismo, y es una medida que se utiliza para frenar, en general, el deterioro de productos almacenados.

1.1.2.3.- Interacciones fúngicas

Cooke y Whipps (1993) establecieron que la competencia entre especies fúngicas se basa en dos estrategias: la captura primaria de los recursos y el combate. Marín y col. (1998 b) sugirieron que la velocidad de crecimiento podría ser un índice de la captura primaria de los recursos, mientras que el índice de dominancia (Lacey y Magan, 1991) lo sería de la habilidad para el combate.

Las interacciones fúngicas juegan un papel importante determinando que especies dominarán el ecosistema de las plantas y/o frutos almacenados bajo unas condiciones ambientales determinadas (Magan y Lacey, 1984).

La interacción entre hifas fúngicas se da inevitablemente y puede dar lugar a interacciones intra e interespecíficas. Además, las interacciones pueden verse modificadas por la temperatura, a_w , composición gaseosa y otros factores. Por ello conocer como influye la a_w y la temperatura en el crecimiento fúngico es de particular importancia para entender la ecología de las especies, tanto individualmente como en sus relaciones interespecíficas.

Las cepas de una misma especie difieren poco en sus requerimientos de a_w y temperatura para crecer. Se han utilizado las velocidades de crecimiento a diferentes a_w y temperaturas como criterio taxonómico para discernir entre especies dentro de un mismo género como es el caso de *Penicillium* (Pitt, 1979).

Las interacciones entre hongos pueden también tener un importante efecto en la habilidad de las cepas para producir micotoxinas.

Por otra parte, muchas veces las mejores condiciones en las que se desarrolla un hongo, no son aquellas en las que crece mejor, sino aquellas en las que presenta una mayor competencia frente a otros hongos (Magan y Lacey, 1984).

Se ha demostrado que las interacciones fúngicas sobre agar pueden abarcar desde el entrecruzamiento entre hifas sin efecto sobre la ratio de crecimiento de ambas colonias, pasando por la inhibición mutua en contacto o a distancia, hasta la inhibición de un microorganismo, mientras que el otro continúa creciendo sobre él. Asignando valores a éstas relaciones se pueden obtener los Índices de Dominancia (I_D) descritos por Magan y Lacey (1984), que nos dan una idea de la habilidad de un hongo para competir y dominar sobre otro bajo determinadas condiciones ambientales.

1.2.- Control Biológico

A lo largo de la historia, la agricultura ha tenido como papel fundamental el proporcionar alimentos a la humanidad. Conforme la población fue aumentando también lo hizo la demanda de alimentos y en la segunda mitad del siglo XX se produjo un gran auge en la agricultura. Los incrementos de la producción agrícola fueron posibles gracias al desarrollo de la maquinaria agrícola y a las nuevas técnicas de cultivo, a la mejora genética de las variedades cultivadas, al aumento de la superficie de cultivo en regadío, y al uso de productos agroquímicos, fitosanitarios y fertilizantes.

El uso indiscriminado de plaguicidas, tanto fungicidas, herbicidas, como insecticidas, etc., en un principio, permitió proporcionar un suministro continuo de alimentos para el hombre y los animales, pero, posteriormente, desencadenaron una serie de alteraciones medioambientales, que han influido en el deterioro del suelo, la pérdida de biodiversidad, la contaminación de las aguas, y el aumento de las enfermedades que atacan a los cultivos debido al desarrollo de especies resistentes a los plaguicidas.

Los compuestos químicos no sólo dañan a las plantas cultivadas, sino que también influyen sobre los microorganismos que viven en el suelo, y ésto en algunas ocasiones produce una disminución del número de depredadores útiles y de los organismos antagónicos de los patógenos. Con frecuencia, el uso de fungicidas y otros plaguicidas específicos contra un patógeno particular, provocan un aumento en la población de otros patógenos que no son afectados por el plaguicida específico, así como en la gravedad de las enfermedades que ocasionan. Esto sucede incluso en el caso de algunos fungicidas sistémicos de amplio espectro, que controlan a la mayoría de los patógenos, pero no a todos.

Por otra parte, los consumidores están preocupándose cada vez más por los efectos directos, indirectos y acumulativos que los plaguicidas tienen sobre la calidad de los alimentos, la salud y el medio natural. Existe un consenso cada vez mayor de que los métodos de cultivo basados en el uso de productos químicos de síntesis son

insostenibles, y como resultado de ello se están investigando nuevos sistemas más ecológicos para la producción de alimentos.

Por ello, la concepción actual del control de las enfermedades se basa en la integración compatible, racional y sostenible de todos los sistemas de control disponibles: control cultural, control químico y control biológico; lo que se conoce como control integrado. Este sistema de control persigue reducir de modo importante la dependencia de los plaguicidas químicos, y para ello se apoya en la utilización de los métodos de control biológico y en los mecanismos de defensa de las plantas. El esfuerzo que la investigación le dedica se ha incrementado de manera espectacular, y eso se ha empezado a reflejar en el número de agentes de biocontrol disponibles en el mercado o en fase de estudio (Butt y col., 1999; Droby y col., 1998; Janisiewicz y Jeffers, 1997; Rhodes, 1993).

El control biológico fue definido por Cook y Baker (1983) como la disminución de la cantidad de un inóculo o de una actividad productora de enfermedad de un patógeno, a través de uno o más organismos o por el hombre. En un sentido amplio se basa en el uso de organismos vivos con capacidad para controlar plagas y enfermedades de las plantas, y de los productos de poscosecha, ocasionadas por hongos, bacterias, insectos, etc.

El control biológico ofrece una serie de ventajas frente a otros sistemas de lucha (Deacon, 1983): son más seguros; pueden persistir durante más tiempo; producen un efecto insignificante en el balance ecológico; y son compatibles con otros sistemas de lucha.

Además, está reconocido que el control biológico se produce de forma natural sin intervención del hombre, puesto que todas las plagas tienen antagonistas naturales. Por ello, si se conocen los mecanismos de interacción entre un patógeno y los microorganismos antagónicos, el control biológico podrá modificar el equilibrio entre las poblaciones.

1.2.1.- Los hongos en el control biológico

Los hongos poseen un conjunto de características que los hacen agentes de biocontrol potencialmente ideales. Primero, muchas especies saprófitas antagonizan a la mayoría de los organismos de las plagas: patógenos de plantas, malas hierbas e insectos. Segundo, los hongos se desarrollan fácilmente en medios de cultivo pudiendo producirse en grandes cantidades, y ser liberados al medio ambiente como esporas o fragmentos de micelio. Tercero, los inóculos liberados crecerán y producirán nuevo micelio que parasitará o inhibirá la plaga sin dañar a los otros organismos. Cuarto, los hongos tienen la capacidad de sobrevivir durante períodos relativamente largos en formas de reposo y de germinar cuando las condiciones son apropiadas, por lo que no sería necesario la reinoculación con el agente de control. Quinto, los compuestos biológicamente activos de los hongos son efectivos a concentraciones muy bajas, no son persistentes y no causan daño al medio ambiente, por ello pueden utilizarse directamente o bien como sustancia base para la síntesis de análogos más potentes (Wainwright, 1995).

Los hongos en el control de hongos fitopatógenos

Alrededor de un 80% de las enfermedades de las plantas están causadas por hongos y muchas de ellas tienen su origen en el suelo, como las enfermedades de las podredumbres causadas por algunas especies de *Pythium*, *Pytophthora*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*, y las que debilitan el sistema vascular bloqueando los vasos xilemáticos producidas por hongos de las especies de *Verticillium* y *Fusarium* (Wainwright, 1995).

Se ha observado que algunos suelos agrícolas sostienen cultivos que presentan menos enfermedades que otros próximos sobre suelos diferentes. Baker y Cook (1974) definieron a los suelos que presentaban menos enfermedades como represivos. Incluso aunque un patógeno y su huésped susceptible estén presentes, el desarrollo de la enfermedad disminuye. La naturaleza de la represión se debe a la presencia de hongos anagonistas presentes en esos suelos que, mediante la fungistasis, la competencia

saprofítica y el parasitismo, impiden que los patógenos alcancen poblaciones suficientemente altas para causar enfermedades severas.

Un cierto número de hongos aislados de la rizosfera de plantas de tomate afectadas por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* reprimieron la marchitez por *Fusarium*. Entre ellos se incluyen especies de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* y *Paecilomyces* (Jarvis, 1998). También se ha observado que los hongos del género *Trichoderma*, *Gliocladium* y *Sporodesmium*, reducen las poblaciones y la magnitud de las enfermedades causadas por *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium* y *Sclerotinia* (Carlie y Watkinson, 1997).

Para controlar estos hongos patógenos que viven en el suelo de las plantas, se debe introducir el antagonista en el suelo, o bien incrementar la cantidad de uno existente, si lo hubiese. Además, para que triunfe la competencia de la población microbiana del suelo se requiere una gran cantidad de inóculo del antagonista, como por ejemplo la biomasa de fermentación, que se añade, en ocasiones, al suelo junto con una fuente de energía apropiada como la paja. *Trichoderma harzianum* se ha usado varias veces para el control de *Sclerotinia minor* en lechuga, añadido al suelo en presencia de un fungicida al que es resistente *T. harzianum*, pero *S. minor* y probablemente muchos de los competidores de *T. harzianum* no lo son (Carlie y Watkinson, 1997).

Muchas levaduras y hongos filamentosos son antagonistas eficaces contra hongos que infectan a los órganos aéreos de las plantas. La inoculación posfloral de las flores de tomate con conidios de *Cladosporium herbarum* o especies de *Penicillium*, eliminaron casi por completo la infección posterior de los frutos en desarrollo, causada por *Botrytis cinerea*. Del mismo modo, la diseminación de esporas de organismos comunes de la corteza como *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp. y *Trichoderma* sobre árboles frutales podados, evita la infección que causan los patógenos inductores del chancro como *Nectria galligena* y *Cytospora* sp.

Las podredumbres de poscosecha de varios frutos pueden reducirse, de manera considerable, aplicando sobre ellos esporas de hongos antagonistas durante las diferentes etapas de desarrollo del fruto, o bien sumergiendo los frutos cosechados en el inóculo. Por ejemplo, se logró reducir de forma significativa la pudrición verde de los

cítricos, causada por *Penicillium digitatum*, al tratar los frutos con el antagonista *Trichoderma viride*, mientras que la podredumbre de precosecha y poscosecha de la fresa, debida a *Botrytis*, fue reducida aplicando esporas de *Trichoderma* sp. sobre las flores y frutos jóvenes (Agrios, 1999).

Los hongos en el control de insectos

Más de 400 especies de hongos atacan insectos y ácaros, de forma que existe un gran potencial para el uso de estos organismos como insecticidas biológicos. Los hongos como agentes de biocontrol de insectos son potencialmente superiores a otros microorganismos, al no ser, generalmente, específicos en su acción, y por tanto más útiles frente a un amplio rango de plagas de insectos (Quinlon, 1988). No obstante, su uso está limitado por el rango de humedades a las cuales pueden crecer, siendo necesaria una humedad absoluta del 90%, durante un periodo de tiempo relativamente largo, para que los hongos puedan crecer e infectar al insecto huésped. Otra desventaja, es que los hongos rara vez matan a los insectos de forma rápida, como lo hace un insecticida químico. Por ello, no puede esperarse que los hongos actúen como agentes instantáneos de destrucción, sino más bien, deben ser utilizados para el control de los insectos a largo plazo.

La mayor parte de los hongos entomopatógenos atacan la cutícula externa o el intestino de los insectos huéspedes. La muerte del insecto se origina por la producción de metabolitos secundarios del hongo o por la utilización directa, por parte del hongo, de los fluidos del cuerpo del insecto, y en este caso, se produce un gran desarrollo de las hifas del hongo en el interior del insecto. El hongo muere, una vez agotadas las reservas del insecto, entonces esporula y la masa de esporas actúa como foco para futuras infecciones.

Los mejores ejemplos del uso de los hongos en el control de insectos son las especies de *Beauveria* y *Metarhizium*, hongos que causan la muerte de los insectos de las uvas blancas y verdes de moscatel. *Beauveria* produce un conjunto de metabolitos, de los cuales el más conocido es la beauverina que actúa modificando la permeabilidad

de las membranas. De *Metarhizium* se han aislado dos metabolitos, la destruxina y la citochalasin. La primera de ellas actúa sobre las membranas de las mitocondrias y del retículo endoplásmico del músculo del insecto paralizándolo. La acción de la citochalasin es menos clara, aunque parece inhibir la respuesta inmune del insecto.

El micoinsecticida ideal debería poseer fácil poder de penetración en la cutícula del insecto, producir metabolitos de acción rápida para ocasionar la muerte del insecto, colonizar de inmediato el cuerpo del insecto y luego esporular bajo un mayor rango de condiciones ambientales. Un problema obvio es que los hongos utilizados para el control de insectos, pueden morir a causa de los insecticidas que se esparcen sobre las cosechas infestadas de insectos; pero este problema podría solventarse seleccionando cepas del hongo resistentes a los insecticidas (Wainwright, 1995).

Los hongos en el control de nemátodos

Los nemátodos ocasionan grandes pérdidas en los cultivos. Los hongos nematófagos atacan a los nemátodos atrapándolos, y digieren su cuerpo al crecer como endoparásitos en el interior de sus cuerpos, y al invadir y parasitar sus masas de huevos.

Existen suelos que por sí solos son supresivos para los nemátodos. Se trata de suelos con una carga fúngica natural importante. Los nemátodos enquistados *Heterodera* y *Globodera* son parasitados por los hongos *Catenaria auxiliaris*, *Nematophthora gynophila* y *Verticillium clamydosporium*, mientras que el nemátodo agallador de la raíz, *Meloidogyne* sp. es parasitado por el hongo *Dactylella oviparasitica* (Agrios, 1999).

También la mejora de los suelos añadiendo productos de la degradación de materiales orgánicos junto con un aumento de los antagonistas naturales resulta efectiva en la reducción de las poblaciones de nemátodos. La adición de quitina ha sido ampliamente estudiada como una forma de aumentar las poblaciones de antagonistas específicos. La producción de quitinasa por estos organismos puede destruir la quitina de la cubierta de los huevos de los nematodos, pero es difícil creer que éste sea el mecanismo más importante de acción (Wainwright, 1995).

Los hongos en el control de las malas hierbas

Los hongos patógenos específicos de plantas pueden ser usados para el control de las malas hierbas de los cultivos. Desde hace tiempo se conoce que los hongos pueden matar a las malas hierbas, pero el uso de los hongos para su control es relativamente reciente. Los hongos usados para ese fin se les denominan micoherbicidas, y los que presentan mayor posibilidad de usarse como micoherbicidas son las especies de los géneros *Alternaria*, *Ascochyta*, *Bipolaris*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Microsphaeropsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phytophthora* y *Sclerotinia* (Carlie y Watkinson, 1997).

Se han desarrollado dos métodos de control de las malas hierbas: el método inundativo o con micoherbicida, y el método de biocontrol clásico.

El primero se basa en la aplicación masiva de dosis de hongos para conseguir un nivel de epidemia alto, cuando las condiciones son las idóneas para el desarrollo de las malas hierbas. El agente de biocontrol persiste en el suelo y controla la población de hierbas. El micoherbicida se produce en grandes cantidades y se formula, utilizándose como un herbicida químico.

El método clásico se consigue en un periodo de tiempo más largo y depende del aumento gradual de la enfermedad. Este desarrollo a largo plazo del agente de biocontrol implica que el control de las malas hierbas pueda tardar meses, incluso años.

Collego (Ecogen) es una formulación humedecible de *Colletotrichum gloeosporoides* que se utiliza para el control de la arveja (*Aeschynomene virginica*) en arroz y judía de soja. Se aplica cuando las hierbas están emergiendo a través del dosel de la cosecha. Se han conseguido porcentajes de control por encima del 90%. Su uso aumentó después de que se prohibiera el herbicida químico 2,4,5-T en el cultivo del arroz.

Sin embargo, el ejemplo con más éxito de los hongos, en el control biológico de las malas hierbas, es el de la roya *Puccinia chondrillina* para controlar la achicoria dulce (Wainwright, 1995).

1.2.2.- Mecanismos de control

Existe una gran variedad de mecanismos por medio de los cuales los organismos dificultan la actividad patogénica de otros, aunque, en general, pueden ser resumidos en tres: antibiosis, competencia y parasitismo (Fravel, 1988).

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general, no tienen un único tipo de acción, y el poseer varios de ellos les convierte en posibles agentes de biocontrol. Además, si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de que el patógeno desarrolle sistemas de resistencia (Jarvis, 1998).

Antibiosis

La antibiosis, en sentido estricto, es el antagonismo ejercido por los metabolitos de origen microbiano con actividad biocida, entre los cuales se encuentran los agentes líticos, los enzimas, los compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas. Estos organismos, por lo tanto, tienen el potencial para actuar como fuente de compuestos antifúngicos de uso en la agricultura. Los posibles antagonistas deben ser capaces de producir metabolitos activos, no sólo en medios artificiales sino también en condiciones naturales (Jarvis, 1998). Por ejemplo los metabolitos producidos por *Trichoderma harzianum* se han evaluado para el control de patógenos de plantas. Este hongo produce un metabolito denominado harzianopiridona. Las piridonas fúngicas son relativamente raras y este es el primer ejemplo de un compuesto de este tipo producido por especies de *Trichoderma*. Muestras de extracto puro han sido producidas por fermentación y se ha demostrado que son moderadamente activas contra la costra de la manzana (*Venturia inaequalis*), el tizón tardío del tomate (*Phytophthora infestans*) y *Botrytis cinerea* (Wainwright, 1995).

Competencia

La competencia constituye un mecanismo de acción antagónico muy importante, y ésta puede producirse por los nutrientes o bien por el espacio.

La competencia por los nutrientes se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los otros. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento, porque si hay exceso no hay competencia. Por ejemplo, *Botrytis* y *Penicillium expansum* son hongos típicamente de poscosecha, y para que sus esporas germinen necesitan alimentos, los cuales se encuentran en las heridas de las frutas, y es allí donde ambos competirán para conseguir el alimento.

La competencia por el espacio también ha sido evaluada. Las levaduras son eficaces colonizadoras de la superficie de las plantas y destacan por producir compuestos extracelulares, principalmente polisacáridos, que restringen el espacio para que otros microorganismos lo colonicen (Fernández-Larrea, 2001).

Parasitismo

En la naturaleza el parasitismo es muy corriente, y se trata de la acción directa de un microorganismo parasitando a otro, donde el patógeno es utilizado como alimento por su antagonista. Este tipo de mecanismo se basa en la producción, por parte del antagonista, de enzimas extracelulares, como la quitinasa, la celulasa, la β ,1-3-glucanasa y la proteasa, que utilizará para romper las estructuras del patógeno, y poderlo parasitar. Los ejemplos más conocidos de hongos parásitos son *Trichoderma* y *Gliocladium*. En *Trichoderma*, el parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, el engrosamiento de hifas, la producción de haustorios, y la desorganización del contenido celular (Carlie y Watkinson, 1997; Fernández-Larrea, 2001).

1.3.- *Penicillium oxalicum* Currie and Thom

1.3.1.- Caracteres morfológicos y culturales

Las colonias de *Penicillium oxalicum* alcanzan un tamaño de 35-60 mm de diámetro en 10 días, son planas o estriadas radialmente, y con áreas centrales aterciopeladas o ligeramente algodonosas, de aspecto compacto a causa de la abundante producción de conidios, y con gotitas de exudado claro y brillante (Figura 1). El micelio es inconspicuo, de color blanco o amarillo claro en las áreas algodonosas, pero la superficie de crecimiento fundamental está coloreada de verde. El reverso de la colonia es amarillo claro, marrón o naranja. La producción de conidios es muy abundante, típica del género, y de color verde grisáceo.



Figura 1: Aspecto de la colonia de *P. oxalicum* crecida en PDA.

Los conidióforos (penicilio o pincel) nacen de la superficie del micelio dando lugar a estructuras diverticuladas y asimétricas, y algunas veces presentan ramas adicionales (Figuras 2 y 3).



Figura 2: Conidióforo de *P. oxalicum* (400 X).



Figura 3: Conidióforo de *P. oxalicum* con ramificación lateral (400 X).

El estipe, en general, de 200-400 μm de longitud, con delgadas y lisas, y con verticilos terminales característicos con 2-4 métulas de 10-15 (-30) μm de longitud. Fiálides de cilíndricas a lanceoladas con punta estrecha de 10-15 (-20) μm de longitud. Los conidios son elipsoidales, muy grandes (3.5-5.0 (-7) μm de longitud), y de pared lisa o ligeramente rugosa algunas veces (Pitt y Hocking, 1999; Samson y col., 2000).

Micotoxinas

Destacar el ácido secalónico (D y F) que es producido por una gran diversidad de hongos taxonómicamente distintos. El ácido secalónico D es el mayor metabolito producido por *P. oxalicum* y es tóxico para los animales. Además, *P. oxalicum* produce otros metabolitos de toxicidad desconocida como: meleagrina, oxalina, anthglutina, oxalicina y ácido oxalico (Pitt y Hocking, 1999; Samson y col., 2000).

Ecología

Ha sido aislado del maíz, arroz, sorgo, cebada, cacahuete, nueces, judías, semillas de soja y de judía, pimienta negra, cilantro y arroz molido; pero el mejor nicho ecológico para *P. oxalicum* es el maíz de precosecha. Se ha demostrado que es la especie aislada más común del maíz recién recolectado, mientras que su frecuencia en el maíz almacenado es mucho más baja. Se piensa que el hongo entra en las espigas del maíz cuando éstas maduran, a través de los daños o heridas causados por los insectos. (Pitt y Hocking, 1999; Samson y col., 2000).

1.3.2.- Enfermedades causadas por *Penicillium*

La mayoría de las especies del género *Penicillium* destacan, principalmente, porque son hongos de almacén. Son los causantes de las “podredumbres azules o verdes” en cítricos, frutos de hueso y de pepita, uvas, melones, higos, cebollas, y hortalizas en general. En general, las podredumbres por *Penicillium* son las más

comunes de todas las enfermedades de poscosecha y, por consiguiente, las responsables de que los productos se estropeen, durante el transporte y almacenamiento, antes de llegar a los consumidores.

No obstante, se ha visto que algunas especies de *Penicillium* pueden ser patógenas de campo. Entre ellas se encuentra la especie *P. oxalicum*, que ocasiona la podredumbre del moho azul en las mazorcas del maíz (Baird y col., 1996; Smith y col., 1992) y en el sorgo (Ye y col., 1995), siendo prácticamente muy baja su presencia en maíz almacenado.

Los hongos de almacén penetran en los tejidos del fruto a través de las aberturas de la cáscara o de la piel, pero pueden propagarse a los frutos sanos al entrar en contacto con los frutos infectados. Las podredumbres se manifiestan como manchas blancas, aguanosas, que pasan de ser superficiales a hundirse con rapidez y, en pocos días, gran parte del fruto se estropea. Después de producirse la pudrición, un moho blanco empieza a desarrollarse sobre la superficie del fruto, cerca de la parte central de la mancha. El área de esporulación adquiere entonces un color azul, verde azulado o verde oliva y, a menudo, rodeada por una franja de micelio blanco. El desarrollo superficial del hongo se producirá siempre que la atmósfera sea húmeda y cálida. Sin embargo el factor más importante que favorece estas podredumbres, sobre todo a principios de la temporada de almacenamiento, son los daños mecánicos que sufre la superficie del fruto (Agrios, 1999).

1.3.2.1.- Control de las enfermedades causadas por *Penicillium*

El control de las podredumbres por *Penicillium* depende de que también se controle a los patógenos que las ocasionan en el campo, a fin de que la cosecha no se contamine durante su recolección y posteriormente durante el almacenamiento. La cosecha debe recolectarse y manipularse cuidadosamente, para evitar heridas, abolladuras y otros daños que puedan servir de foco de entrada para el patógeno. Además, debe realizarse cuando el tiempo sea seco y frío para evitar la contaminación e infecciones posteriores, así como enfriarse tan rápido como sea posible para prevenir el

establecimiento de nuevas colonias y el desarrollo de las ya existentes. El almacenamiento debe hacerse a una temperatura suficientemente baja para retardar el desarrollo de las infecciones y la degradación fisiológica de los tejidos, pero no demasiado baja por que el frío puede ocasionar daños en el producto, los cuales servirán de entrada a los hongos. La superficie de los productos no debe estar húmeda cuando se almacenen y debe haber una ventilación adecuada para prevenir una humedad relativa excesiva.

Las podredumbres de poscosecha pueden ser controladas mediante tratamientos con compuestos químicos, los cuales previenen la infección e inhiben el desarrollo del patógeno sobre la superficie de los huéspedes enfermos. Algunos fungicidas y compuestos químicos que liberan amoníaco o forman tricloruro de nitrógeno se utilizan como fungistáticos suplementarios y volátiles, los cuales se impregnan en hojas de papel durante el almacenamiento y transporte de la cosecha. Existen muchas cepas resistentes a uno o varios fungicidas sistémicos, por lo que es aconsejable el uso de programas de control con fungicidas de amplio espectro de acción.

Los rayos gamma también se utilizan para disminuir la frecuencia de las podredumbres de algunas cosechas almacenadas.

Por último, se están investigando y desarrollando métodos de control biológico que muestran una gran eficacia contra hongos y bacterias que producen podredumbres de poscosecha, pero muchos de ellos están en fase experimental (Agrios, 1999).

1.3.3.- *Penicillium oxalicum* en el control biológico

Algunas especies de *Penicillium*, además de causar daños pudriendo frutos, bulbos o granos, también pueden ser importantes como agentes de biocontrol frente a diversos patógenos vegetales. Así, *P. funiculosum* contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Marois y col, 1981 c); *P. lilacinum* contra *Phomopsis sclerotioidea* (Ebben y Spencer, 1979); *P. vermiculatum* contra *Verticillium dahliae* (Marois y col, 1984); y *P. oxalicum* contra diversos patógenos del guisante (Windels y Kommedahl, 1982), frente a *Pythium ultimum* (Agrios, 1999; Callan y col, 1996), así como contra

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* (De Cal y col., 1995, 1997 b, 1999, 2000; De Cal y Melgarejo, 2001).

P. oxalicum es considerado por distintos autores como un prometedor agente fúngico para el control de las enfermedades del suelo (Huang y Kuhlman, 1991; Ownley y Benson, 1987; Pandey y col., 1993; Windels y Kommedahl, 1978), y ha sido referenciado como productor de un amplio rango de polisacaridos y enzimas que degradan la pectina (Ikotun, 1984), también glucanasas, celulasas, hemicelulasas y otras enzimas (Pérez y col., 1982).

Por otra parte, resaltar los trabajos que en los últimos 10 años está realizando el grupo de P. Melgarejo del INIA de Madrid, sobre una cepa de *P. oxalicum* que actúa como antagonista de distintas cepas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* que causan la fusariosis vascular del tomate. Prueba de ello son las múltiples publicaciones realizadas al respecto (De Cal y col., 1995, 1997 a y b, 1999, 2000; De Cal y Melgarejo, 2001; García Lepe y col., 1998; Larena y col., 2002; Pascual y col., 2000). En ellas se demuestra que *P. oxalicum* es capaz de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en estudios “*in vitro*” de crecimiento dual, al producir enzimas líticos (Alfonso y col., 1992) que degradan la pared celular del patógeno. También en experiencias en invernadero han podido comprobar que *P. oxalicum* disminuye la fusariosis del tomate, tanto al inocularlo en suelos que han sido esterilizados como en los que no. Así como, que es capaz de inducir resistencia en las plantas de tomate frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, activando los mecanismos de defensa de la planta, consiguiéndose una reducción de la enfermedad del 20-50%, después de aplicar distintos tratamientos con *P. oxalicum* según la severidad de la enfermedad. La inmunidad, que *P. oxalicum* confiere a las plantas, se mantuvo durante 60-100 días después de inocular el patógeno.

1.4.- *Trichoderma harzianum* Rifai

1.4.1.- Caracteres morfológicos y culturales

Las colonias presentan un crecimiento rápido, poco uniforme y con penachos de pelos aislados, al principio hialinas y después adquieren tonalidades de color verde debido a la producción de conidios (Figura 4). El micelio es de color verde blanquecino (verde oliva), y los conidios amarillo-verdoso que se desarrollan sobre toda la superficie. El reverso de la placa es amarillento.

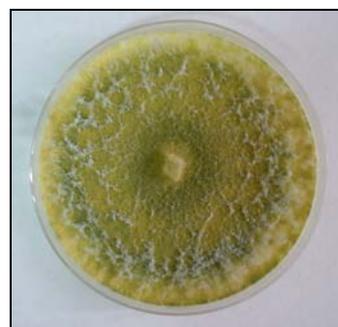


Figura 4: Aspecto de la colonia de *T. harzianum* crecida en PDA.

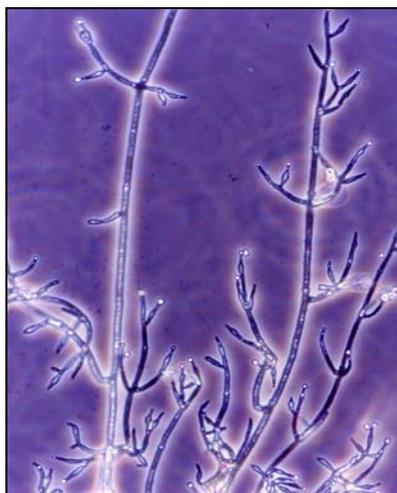


Figura 5: Estructuras reproductoras asexuales de *T. harzianum* (400 X).

Los conidióforos consisten en estructuras muy ramificadas (Figuras 5 y 6). De las ramas principales nacen ramas laterales que a su vez se vuelven a ramificar, todo ello en ángulo recto y dando lugar a una figura piramidal. Las fiálides, en forma de frasco, surgen de cada rama, normalmente de 5-7 x 3.0-3.5 μm , más grandes cuanto más apicales son, y de ellas nacen los conidios simples, que a menudo se adhieren en pequeños clusters. La forma de los conidios varía de esferoidal a subesferoidal, y a veces son elipsoidales, de 2.5-3.2 (-4.0) μm de diámetro o de largo, y con pared lisa. Las clamidosporas están

presentes en el micelio de las colonias viejas, en posición intercalar, pero a veces terminales, en su mayoría, globosas, hialinas y de pared lisa. Los metabolitos más importantes son la gliotoxina, la emodina y la trichodermina (Pitt y Hocking, 1999; Samson y col., 2000).

Taxonomía

En un principio las especies verdes de *Trichoderma* eran determinadas como *T. viride* hasta que fueron subdivididas por Rifai (1969). Por ello es posible que mucha de la información que actualmente existe para *T. viride* esté basada en estudios sobre *T. harzianum*. Sin embargo el nombre de *T. viride* todavía se utiliza para describir especies verdes del género. La principal diferencia entre *T. viride* y *T. harzianum* es que en el primero de ellos la ornamentación de la pared conidial es rugosa, y presenta conidios de mayor tamaño (3.5-4.5 μm de diámetro).



Figura 6: Conidióforos de *T. harzianum* (1000 X).

La estructura del conidióforo es similar en ambas especies, pero generalmente es más compleja en *T. harzianum*. Las dos producen colonias verdes poco uniformes características del género. Domsch y col. (1980) sugieren que para comprobar la rugosidad de la pared hay que examinar los conidios después de dos semanas. Por ello, los estudios de estas dos especies deberían ser tratados con precaución ya que, como se ha dicho antes, muchas de las cepas de *Trichoderma* con conidios verdes han sido consideradas como *T. viride*. (Pitt y Hocking, 1999; Samson y col., 2000).

Micotoxinas

No se ha demostrado que *T. harzianum* produzca micotoxinas. Sin embargo existen importantes evidencias de que algunas especies de *Trichoderma* son beneficiosas. (Pitt y Hocking, 1999; Samson y col., 2000).

Ecología

T. harzianum es un hongo de distribución cosmopolita que vive en el suelo, tanto en suelos de cultivo como forestal, y está considerado como un importante biodegradador, especialmente de la madera (Domsch y col., 1980). *T. harzianum* ha sido aislado del suelo, papel, productos textiles, así como de tubérculos de mandioca y boniato, guisantes, judías, semillas de soja, frutos secos como maíz, sorgo, cacahuete y pecana, y en granos almacenados como trigo, arroz y cebada. (Pitt y Hocking, 1999; Samson y col., 2000).

1.4.2.- Algunos usos de *Trichoderma*

Industria alimentaria y textil

Trichoderma es capaz de hidrolizar la gelatina, caseína, leche, la carboximetilcelulosa y la quitina, lo cual indica que es un excelente productor de enzimas líticas de carácter proteolítico, celulolítico y quitinolítico (Cherif y Benhamou, 1990; Lorito y col., 1993; Sivan y Chet, 1989; Stefanova y Sandoval, 1995).

Estas enzimas son usadas con frecuencia en la industria textil y alimentaria para tales fines. En la industria textil, las celulasas se emplean en el proceso de prelavado de las telas vaqueras, para conferirles con mayor facilidad el color blanco y darles el aspecto de “lavados a la piedra” (Raven y col., 1999). En cuanto a la industria alimentaria, son un componente del alimento para aves, con el fin de incrementar la digestibilidad de las hemicelulosas de la cebada y otros cereales (www.iicasaninet.net).

Promotores de crecimiento de las plantas

Durante muchos años ha sido conocida la habilidad de los hongos para incrementar la tasa de crecimiento y desarrollo de las plantas, en especial de su sistema radicular por la producción de hormonas vegetales como las auxinas. Se ha demostrado

que biopreparados de *T. harzianum* (Sandoval y col., 1994) aplicados a plantas de tomate y pimiento favorecen su desarrollo, al conseguirse plantas de mayor altura, hojas más grandes y un crecimiento radicular de mayores dimensiones. También en el cultivo del tabaco se ha conseguido obtener plantas de mayor peso, altura y hojas de dimensiones más grandes, mediante el uso de biopreparados de especies de *Trichoderma* (Sandoval y col., 1992).

Weber y col. (2000) observaron que *T. viride* y *T. harzianum* promovían el crecimiento de plantas ornamentales y que al mismo tiempo eran protegidas frente a *Fusarium oxysporum*, patógeno que ocasiona los marchitamientos vasculares en sus huéspedes.

Recientemente, se encontró que una cepa de *Trichoderma* contribuía al crecimiento, en profundidad, de las raíces del maíz y de algunos pastos, haciendo que estos cultivos fueran más resistentes a la sequía. Otro estudio indica que las raíces de las plantas de maíz colonizadas por *Trichoderma* T22 requieren un 40% menos de fertilizantes nitrogenados en relación a las raíces que no se encuentran colonizadas (www.iicasaninet.net).

Como fuente de transgenes

Los agentes de biocontrol, casi por definición, deben contener un considerable número de genes que codifiquen sustancias que puedan utilizarse para el control de plagas y enfermedades. Un atributo valioso de las especies de *Trichoderma* es que permiten ser manipuladas genéticamente y ser seleccionadas por su resistencia a los fungicidas, así como favorecer sus aptitudes parasíticas y antagonísticas, y pueden ser adaptadas a rizosferas específicas (Jarvis, 1998; Papavizas, 1985; Papavizas y Lewis, 1981; Papavizas y col., 1982).

Algunos genes de *Trichoderma harzianum* han sido manipulados genéticamente e introducidos en plantas para proporcionarles resistencia a varias enfermedades. Por ejemplo, plantas de tabaco y patata han sido transformadas para expresar el gen fungal de la endoquitinasa, el cual confiere alta resistencia a *Alternaria alternata* (hongo fitopatógeno del tabaco) y a *Rhizoctonia solani* (hongo fitopatógeno de la patata) (www.iicasaninet.net).

1.4.3.- *Trichoderma* en el control biológico

Las especies de *Trichoderma* son importantes como agentes de biocontrol (Wainwright, 1995) y es uno de los géneros fúngicos con mayor potencial para el control de las plagas que afectan a la agricultura (Santamarina y col., 2001). Distintos autores han referenciado su utilización como antagonista de otros hongos (Bari y col., 2000; Bruce y col., 1995; Bunker y Mathur, 2001; Jijakly y Lepoivre, 1995; Kurzwinska y Pacyna, 2000; Latorre y col., 1997; Martins y De Melo, 1998; Papavizas, 1985; Santamarina y col., 2002 a; Stirmanova, 1994; Thrane y col., 1997). Estos hongos son empleados en numerosas ocasiones, con o sin registro legal, para el control de enfermedades de las plantas. Diversas especies de este género se utilizan en el tratamiento de semillas (Das y Hazarika, 2000; Harman y col., 1989; Samaniego y Gámez, 2000), e incluso contra hongos que causan la degradación de la madera (Canessa y Morell, 1996). Además las especies de *T. vidide* y *T. harzianum* se han reconocido como bioplaguicidas principalmente contra *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Sclerotinia* y *Botrytis* (Lewis y Papavizas, 1991).

En los años treinta Weinding demostró que especies de *Trichoderma* podían tanto parasitar como producir antibióticos contra *Rhizoctonia solani*, y sugirió que los hongos saprofitos podrían ser utilizados para el control de patógenos en condiciones de campo.

Ahora se sabe que *Trichoderma* utiliza varios mecanismos de acción para controlar el desarrollo de los patógenos. Algunos de ellos son el micoparasitismo, la

antibiosis, la competencia por los nutrientes y la producción de compuestos volátiles (Bruce y col., 1995; Chet, 1987; Dal Bello y col., 1997; Fernández-Larrea, 2001; Jarvis, 1998; Marchetti y col., 1992); de todos ellos, el que tiene un papel principal es el parasitismo. El presentar más de un mecanismo de control le confiere una característica importante, poder ser seleccionado como agente de biocontrol. En algunos casos, *Trichoderma* actúa sobre los patógenos gracias a su capacidad de colonizar rápidamente el sustrato.

Algunos hongos son inhibidos por compuestos volátiles o por metabolitos solubles. Entre los compuestos volátiles las alquil pironas (Claydon y col., 1987) son las más efectivas, y entre los metabolitos solubles se encuentra la ciclosporina producida por *T. polysporum* (Dreyfuss y col., 1976), los antibióticos de tipo isonitrilo y la tricodermina producidos por *T. hamatum* (Fujiwara y col., 1982; Riisom y col., 1987), y como principal agente soluble antifúngico las trichozianinas (Bodo y col., 1985). *T. harzianum* además de producir trichozianinas sintetiza una gran variedad de compuestos solubles como la harziandiona (Ghisalberti y col., 1992), la furanona (Orentlich y col., 1992), la harzianolida (Claydon y col., 1991) y el harzianum A (Corley y col., 1994). La composición de esta mezcla de sustancias antagónicas difiere enormemente entre las diferentes cepas, de ahí la importancia de estudiar aquellas cepas que ofrecen mejores resultados y averiguar la naturaleza de las sustancias que producen.

Aunque la versatilidad, adaptabilidad y fácil manejo de los hongos de *Trichoderma* han permitido su utilización en el control biológico, existen ciertas limitaciones para el avance en las investigaciones, debido a las deficiencias en las tecnologías de formulación, así como en buscar un sistema homogéneo de reparto para ser utilizado en condiciones de campo. Sin embargo, existen formulaciones de hongos antagonistas (<http://attra.ncat.org/attra-pub/ipmappendixb.doc>), concretamente en la última revisión de febrero de 2003 son varias las cepas de *Trichoderma* que se encuentran ya formuladas y disponibles en el mercado (Tabla 1), mientras que en el año 2000, sólo había una cepa de *Trichoderma*. Esto nos demuestra la importancia que han cobrado las investigaciones en este campo y, concretamente, en este género.

Tabla 1: Formulados de *Trichoderma* disponibles en el mercado.

Agente de Biocontrol	Nombre Comercial	Distribuidor	Patógeno controlado	Tipo de acción	País de registro
<i>T. harzianum</i>	RootShield™ BioTrek 22G™ Supresivit™ T-22G™ T-22HB™	BioWorks, Wilbur-Ellis, Borregaard	Patógenos del suelo: <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Sclerotium</i> , y otros.	Parasitismo, competencia	U.S.A, Europa
<i>T. harzianum</i>	Trichodex™	Makhteshim	<i>Botrytis cinerea</i> y otros	Micoparasitismo	Israel
<i>T. harzianum</i> y <i>T. polysporum</i>	Binab™	Bio-Innovation	Patógenos causantes de daños en árboles	Micoparasitismo	U.K., Suecia
<i>T. harzianum</i> y <i>T. viride</i>	Trichopel™ Trichojet™ Trichodowels™ Trichoseal™	Agrimm Technologies	<i>Armillaria</i> , <i>Botryoshaeria</i> , y otros		Nueva Zelanda
<i>Trichoderma</i> <i>spp.</i>	Promot™ Trichoderma 2000 Biofungus	J.H. Biotech Mycontrol, Ltd. De Ceuster	Promotor de crecimiento. <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium</i> <i>spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> en semillero y campo		U.S.A U.S.A Bélgica
<i>T. viride</i>	Trieco	Ecosense Labs	Para controlar a <i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Pythium</i> <i>spp.</i> , y <i>Fusarium spp.</i> , que causan podredumbre de la raíz, semillas, cuello; pudrición roja, damping-off y pudrición por <i>Fusarium</i> en una amplia variedad de cultivos		India

Algunos métodos de control consisten en aplicar, directamente en los suelos del campo, una mezcla de esporas de *Trichoderma* con partículas de diatomea que contengan una solución de melazas al 10%. El control de *Sclerotium rolfsii*, que afecta principalmente al altramuza y a los tomates en invernaderos y a los cacahuetes en condiciones de campo, fue posible utilizando 140 kg/ha de estas partículas, equivalentes a una dosis normal del fungicida pentacloronitrobenzeno (PCNB).

Otro sistema consiste en inocular en el suelo esporas de varias especies de *Trichoderma* y otros hongos usados en el biocontrol sobre partículas de alginato. En este caso se añade a un gel de alginato formulaciones de miga de pan, conidios, clamidosporas y biomasa de fermentación de los hongos. El gel se extrude dentro de

una solución de sal de calcio para formar pequeñas partículas de alginato cálcico (Wainwright, 1995).

Las especies de *Trichoderma* también se usan para el control de los patógenos de los árboles forestales; el ejemplo más conocido de este método es la aplicación de esporas de este hongo para controlar a *Fomes (Heterobasidium) annosus* sobre tocones de árboles cortados. Cuando las esporas de *Trichoderma* se añaden al aceite de las sierras, son liberadas a la superficie del muñón a medida que cae el árbol. Este método sólo tiene un éxito parcial debido a que las esporas no germinan cuando la superficie del muñón del árbol se seca, después de quedar expuesto al aire. Este problema puede ser resuelto aplicando las esporas a un gel que retenga la humedad; alternativamente, los muñones cortados tratados pueden ser cubiertos con una hoja de polietileno para mantener la humedad (Wainwright, 1995).

En Cuba, se elaboran biopreparados a partir de diferentes cepas de *Trichoderma* de modo artesanal y más recientemente mediante producción industrial, y para ello se utiliza la fermentación sumergida y la fermentación en sólido (Fernández-Larrea, 2001; Stefanova y Sandoval, 1995). En la primera su producción está limitada, por la imposibilidad de almacenarla a temperatura ambiente durante mucho tiempo. Por el contrario, la producción industrial surge como una alternativa tecnológicamente eficaz, desde el punto de vista productivo y económico para la obtención de fungicidas biológicos de alta calidad, los cuales tienen un mercado potencial en los países donde la agricultura sostenible está adquiriendo mayor importancia (Fernández-Larrea, 2001).

1.5.- *Rhizoctonia solani* Kuhn.

1.5.1.- Caracteres morfológicos y culturales

Las colonias presentan un crecimiento rápido y poseen un micelio estéril (*Mycelia Sterilia*) que es incoloro en su etapa juvenil pero que se torna amarillo o de color café claro a medida que envejece (Figura 7).



Figura 7: Aspecto de la colonia de *R. solani* crecida en PDA.

El micelio está formado por hifas multinucleadas que se ramifican y crecen casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal (Figura 8). Estas ramificaciones se estrechan, ligeramente, a nivel de la bifurcación, y cerca de ella es donde aparece el septo de separación. Algunas hifas se dilatan adquiriendo un aspecto monilioide que posteriormente se oscurece. El tipo de ramificación es la única herramienta disponible para poder identificar al hongo. En determinadas condiciones, se originan ramilletes de células cortas, anchas, de forma oval o triangular y que se asemejan a esclerocios de color pardo oscuro y son de textura uniforme (Agrios, 1999; Smith y col., 1992).



Figura 8: Hifas ramificadas de *R. solani* (400 X).

Taxonomía

Este hongo es conocido como hongo estéril debido a que durante muchos años se pensó que era incapaz de producir algún tipo de espora, ya fuera sexual o asexual. En la actualidad se sabe que unas pocas especies de este género producen esporas, algunas

de ellas esporas sexuales (basidiosporas) y otras asexuales (conidios). Así, la fase sexuada (forma perfecta) es un Basidiomiceto al que se le denominó *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. (Agrios, 1999).

Ecología

El género *Rhizoctonia* incluye microorganismos del suelo que ocasionan enfermedades graves en muchas plantas, ya que afecta a las raíces, tallos, tubérculos, cormos y otros órganos de las plantas que se desarrollan sobre el suelo. Una vez el hongo se ha establecido en un campo, permanece por tiempo indefinido. La especie *Rhizoctonia solani* es de distribución cosmopolita y, probablemente, se encuentra en la mayoría de los suelos cultivables (Agrios, 1999; Smith y col., 1992).

El hongo se dispersa por la lluvia o el agua de riego llegando a los órganos susceptibles donde inicia el proceso de infección. Se desarrolla bien en suelos húmedos y la temperatura óptima para que se produzca infección es de 15°C a 18°C, pero algunas especies muestran una mayor actividad a temperaturas mayores de 35°C. La enfermedad es más acusada en suelos que son ligeramente húmedos que en suelos secos o que están totalmente inundados. En plantas jóvenes de crecimiento lento la infección es más drástica, debido a que las condiciones ambientales son adversas para su desarrollo. Por el contrario, las plantas de crecimiento rápido tienen la posibilidad de escapar a la infección por *Rhizoctonia*, aún cuando la humedad y la temperatura sean favorables para el hongo (Agrios, 1999).

1.5.2.- Enfermedades causadas por *Rhizoctonia*

Varios géneros producen las enfermedades conocidas como “podredumbres del tallo y raíces”. Uno de ellos es *Rhizoctonia*.

Estas enfermedades están ampliamente distribuidas y causan daños en la mayoría de las plantas anuales (malas hierbas), a casi todas las hortalizas y plantas de

ornato, y a distintos cultivos como judía, remolacha, col y colza, patata y tomate (Agrios, 1999; Van den Boogert, 1999).

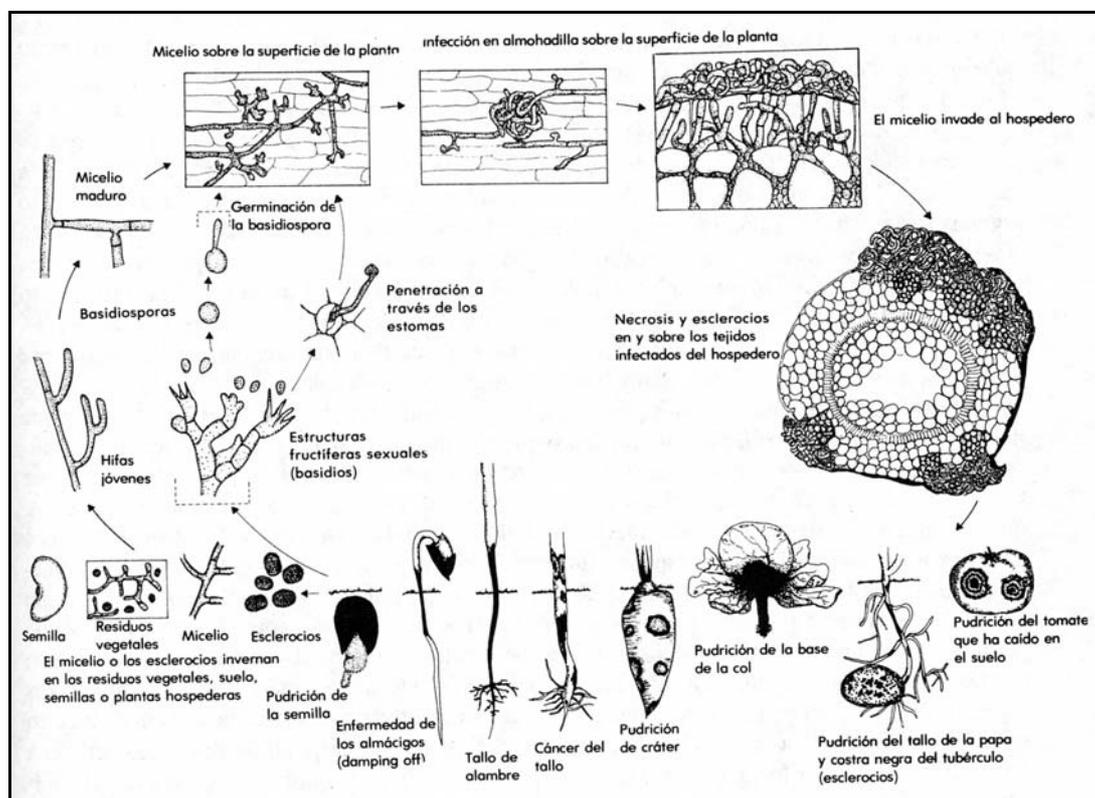


Figura 9: Ciclo de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* (Agrios, 1999).

Los síntomas de las enfermedades pueden variar un poco en los diferentes cultivos e incluso en una misma planta hospedante, dependiendo de la etapa de crecimiento por la que pase la planta en el momento en que es infectada y de las condiciones ambientales predominantes (Figura 9). Los síntomas más comunes, en la mayoría de las plantas, son el ahogamiento de las plántulas y la podredumbre de la raíz, así como la podredumbre y la cancrrosis del tallo de las plantas adultas y en proceso de crecimiento. Sin embargo, en algunos huéspedes, *Rhizoctonia* causa también la podredumbre de los órganos vegetales de reserva y los tizones o manchas del follaje, especialmente de las hojas que se encuentra cerca del suelo.

El ahogamiento, síntoma más frecuente, se produce principalmente en suelos fríos y húmedos. Las plántulas muy jóvenes mueren poco después de emerger del suelo, incluso antes de que emerjan, el hongo ataca y mata al ápice de crecimiento. Una vez que las plántulas han emergido, el hongo ataca al tallo y éste adquiere un aspecto aguado y blando incapaz de sostener a la plántula, por lo que ésta cae y muere. Las plántulas adultas también son atacadas, pero en ellas el hongo invade los tejidos corticales externos produciéndole grandes lesiones de color canela o café rojizo. Dichas lesiones van aumentando en longitud y anchura hasta que finalmente rodean al tallo y la plántula muere, o bien el tallo se ennegrece, dobla, pero no se rompe como ocurre con frecuencia en las crucíferas (Agrios, 1999).

Tizón del arroz

Los síntomas que se observan son unas manchas que aparecen inicialmente sobre las vainas de las hojas de la base del tallo que están cerca de la superficie del agua (cuando el arroz está inundado) o próximas del suelo (en condiciones de secano). Estas manchas son características, tienen forma elíptica y un poco irregular, de 2 a 3 cm de longitud, y con el centro de color blanco grisáceo, mientras que los márgenes son de color café rojizo. La enfermedad progresa rápidamente, extendiéndose de la vaina hacia la hoja; en los ataques severos destruye el tallo (www.novartis.com.co).

Esta enfermedad se ve favorecida cuando en los cultivos hay una alta densidad de plántulas y cuando las condiciones de humedad y temperaturas son elevadas (Rodríguez y col., 2001). Por lo que es considerada una grave amenaza en la producción eficiente y económica del arroz, y en ocasiones también para otros cereales (Agrios, 1999; Damicone y col., 1993; Lee y Rush, 1983; Ou, 1985; Webster y Gunnell, 1992).

Chancros del tallo de las plántulas o “mal del talluelo”

Es frecuente en el algodón y destruye las plántulas que han escapado al ahogamiento, o a la fase de la enfermedad conocida como tizón de las plántulas. Las

lesiones que produce esta enfermedad tienen el aspecto de chancros profundos de color café rojizo que pueden tener tamaño limitado o incluso llegar a rodear por completo la porción del tallo que se encuentra cerca de la superficie del suelo.

El “mal del talluelo” afecta también al tabaco y a otros cultivos en el campo o en semillero. Los chancros de color oscuro y las podredumbres se desarrollan en la base del tallo y se extienden hasta los tejidos leñosos y la médula, así como hacia la parte superior del tallo y de las hojas inferiores. Los tejidos que han sido atacados por el hongo mueren y se colapsan, y el área negra putrefacta se mantiene relativamente seca.

Incluso en la fase de ahogamiento de la enfermedad, se producen lesiones en las raíces de las plántulas, ya que *Rhizoctonia* ataca simultáneamente, tanto a estos órganos como al tallo (Agrios, 1999).

Manchas y podredumbres café

Se trata de una enfermedad producida por *Rhizoctonia* en pastos para césped y prados. Esta enfermedad es particularmente severa durante los períodos de tiempo húmedo o cálido húmedo, especialmente con períodos de abundante rocío. Toma el aspecto de áreas más o menos circulares que tienen un diámetro que va de unos cuantos centímetros hasta uno o más metros, lo cual hace que las hojas del pasto al principio se ennegrezcan y aparezcan húmedas, pero que en poco tiempo se secan, se marchitan y adquieren un color café claro.

A veces, sólo se destruyen las láminas de las hojas, y las plantas del área afectada empiezan a recuperarse y a crecer desde el centro hacia fuera, dando como resultado un área enferma en forma de rosca.

Por otro lado, en los tallos y raíces suculentas y carnosas, así como tubérculos, bulbos, cormos y otros órganos, *Rhizoctonia* causa podredumbres café que pueden ser superficiales o bien extenderse hacia la parte central de la raíz o del tallo. Es frecuente que los tejidos podridos se descompongan y se sequen, formando un área profunda llena de restos de la planta mezclada con los esclerocios y el micelio del hongo. Las lesiones

pueden empezar en la parte superior de la raíz carnosa, y en el campo pueden causar achaparramiento y amarillamiento o la muerte de las hojas. Dichas lesiones pueden también desarrollarse sobre los costados de los tejidos carnosos y extenderse en grado variable, dependiendo del huésped, el tiempo, la presencia de hendiduras, etc. Cuando el tiempo es húmedo, un micelio de color crema, blanco o café, llega a cubrir las lesiones, y cuando los tejidos se pudren y secan, el hongo produce también esclerocios (Agrios, 1999).

Costra negra

En los tubérculos de la patata, *Rhizoctonia* causa síntomas característicos denominados “costra negra”, en los cuales aparecen pequeños esclerocios negros y endurecidos sobre la superficie del tubérculo (los cuales son imposibles de desprender mediante lavado) o bien un “arrosetamiento” o “sarna en roseta”, en el cual la cáscara del tubérculo se endurece de acuerdo a un modelo entrecruzado que se asemeja superficialmente a la sarna común de la patata (Agrios, 1999).

1.5.2.1.- Control de enfermedades causadas por *Rhizoctonia*

Es posible minimizar los daños ocasionados por *Rhizoctonia* en los cultivos, incluyendo dentro de los programas de lucha el manejo adecuado de prácticas culturales, el control biológico y el control químico (Correa-Victoria, 1993; Jarvis, 1998; Ou, 1985; Pantoja y col, 1997; Rodríguez y col., 1999; Sugiyama, 1988; Wainwright, 1995). Para ello deben usarse semillas que no estén infectadas por el hongo o bien, que hayan sido tratadas con agua caliente o algún compuesto químico. Debe evitarse el cultivo en suelos húmedos y muy poco drenados. Las semillas deben sembrarse en camas elevadas y en suelos que presenten las condiciones más adecuadas, a fin de permitir que las plántulas se desarrollen con mayor rapidez. También debe haber espacios amplios entre las plantas para permitir una buena aireación entre ellas y la superficie del suelo. Cuando sea posible, como por ejemplo en los invernaderos y semilleros, debe esterilizarse el suelo con vapor o bien tratarse con compuestos

químicos, puesto que la esterilización ayuda a disminuir el ahogamiento; y además es conveniente la rotación de cultivos, cada tres años, con otro cultivo (Agrios, 1999).

En el caso de los pastos para césped, además de un drenaje adecuado y la eliminación de la paja, se recomiendan las aplicaciones de fungicidas preventivos, especialmente cuando las temperaturas de la noche se mantienen por encima de 21°C o las temperaturas del día son superiores a 28°C. Algunos fungicidas, de contacto y sistémicos, permiten controlar las enfermedades causadas por *Rhizoctonia* (Agrios, 1999).

Pero el mayor esfuerzo se ha centrado en desarrollar métodos de control biológico. Se ha demostrado que este género es parasitado por varios organismos como los hongos *Trichoderma*, *Gliocladium* y *Laetisaria*, varias mixobacterias del suelo y por nemátodos micófitos como *Aphelenchus avena*. Así, la adición de estos organismos a los suelos infestados por *Rhizoctonia* o el tratamiento de las semillas, tubérculos y trasplantes con suspensiones de esporas o micelio de los hongos antagonistas, o bien mixobacterias, antes de realizar la siembra, disminuye de manera considerable la incidencia y severidad de las enfermedades que ocasiona este patógeno en la mayoría de los cultivos. También las enmiendas del suelo añadiendo compost de corteza de conífera, compost orgánico de desechos domésticos, ó paja tienen efectos beneficiosos en el control de las enfermedades, al aumentar las poblaciones de microorganismos ya existentes en el suelo que son antagónicos naturales de *Rhizoctonia* como las distintas especies de *Trichoderma* (Agrios, 1999; Jarvis, 1998).

En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios de laboratorio, invernadero y de campo, que prueban que las especies del género *Trichoderma*, entre ellas *T. harzianum*, son capaces de controlar las enfermedades causadas por *R. solani* (Bari y col., 2000; Bunker y Mathur, 2001; Camporota, 1985, Elad y col., 1987; Geeta y col., 2001; Hadar y col., 1979; Hassanein y col., 2000; Latunde, 1991, Lartey y col., 1994, Patricio y col., 2001; Rajeev-Pant y Mukhopadhyay, 2001; Sabet y col., 2000; Samaniego y Gámez, 2000; Sanjay y Kaushir, 2001; Srivastava y Singh, 2000; Sudhakar y col., 1998; Tronsmo, 1996).

1.6.- *Fusarium oxysporum* Schldl.

1.6.1.- Caracteres morfológicos y culturales

Las colonias alcanzan un diámetro de 30-55 mm en 4 días a 25°C y son blancas al principio. El micelio es de color salmón claro o malva claro, unas veces denso y algodonoso, y otras veces escaso (Figuras 10 y 11). El reverso de la colonia es normalmente de color malva, violeta o magenta oscuro. Es frecuente la presencia de esporodocios insertos en una masa central.



Figura 10: Aspecto de la colonia de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* crecida en PDA.



Figura 11: Aspecto de la colonia de *F. oxysporum* f.sp. *gladioli* crecida en PDA.

Los conidióforos pueden ser ramificados o no y soportan las monofiálides (Figuras 12, 13 y 14). Los macroconidios son de pared delgada y están ligeramente curvados en los extremos, normalmente con 3 septos, en ocasiones más, y a menudo tienen una célula basal pedicelada (Figura 15). Los microconidios, siempre presentes, son abundantes, de fusiformes a arriñonados, producidos en falsas cabezas de cortas y robustas monofiálides en forma de frasco (Figura 15). Las clamidosporas son hialinas, de pared lisa o rugosa y de forma subglobosa de 5-15µm de diámetro (Figura 16); se disponen en cadenas, pares o individuales y en posición terminal o intercalar (Pitt y Hocking, 1999; Samson y col., 2000).

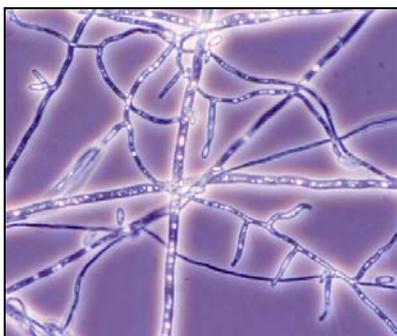


Figura 12: Hifas conidiógenas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (400 X).



Figura 13: Estructuras vegetativas y reproductoras asexuales de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (400 X).

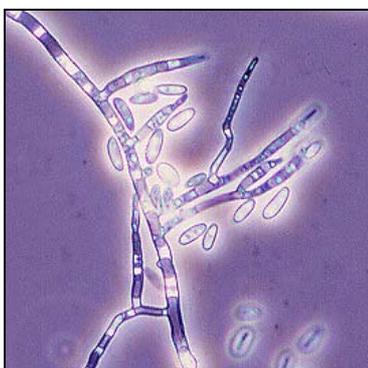


Figura 14: Conidióforo de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (400 X).

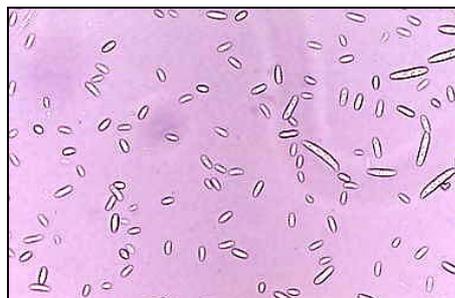


Figura 15: Macro y microconidios de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (400 X).



Figura 16: Clamidosporas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (400 X).

Taxonomía

Dentro de la especie *F. oxysporum* existen muchas razas patógenas de plantas, éstas son las llamadas “formas especiales” (abreviado f.sp.), y las más importantes de éstas son tratadas por Booth (1971). No se conoce teleomorfo alguno (Pitt y Hocking, 1999; Samson y col., 2000).

Micotoxinas

F. oxysporum ha sido referenciado como productor de moniliformina, zearalenona, wortmanina, nivalenol (Tricoteceno), fusarenona y sambutoxina (Pitt y Hocking, 1999; Samson y col., 2000).

Ecología

F. oxysporum es, en primer lugar, un saprofito abundante y activo del suelo y de la materia orgánica, y está geográficamente muy extendido. Algunas cepas tienen una actividad patogénica específica y atacan a muchos cultivos de plantas: patatas, coles, melones, aceite y dátil de palma, tomates, semillas de soja, guisantes, judías, trébol, algodón, bulbos de cebolla, etc. No es de extrañar su presencia en alimentos como cereales: maíz, arroz y cebada; frutos secos: cacahuetes, pecana, avellanas y nueces. Debido a que pueden crecer en condiciones bajas de O₂, *F. oxysporum* ha causado daños en el proceso de UHT de zumos de frutas (Pitt y Hocking, 1999; Samson y col., 2000).

1.6.2.- Enfermedades causadas por *Fusarium*

Las especies de *Fusarium* están referenciadas como hongos de campo, pero no es extraño encontrarlos, ocasionalmente, como hongos de almacén (Santamarina y col., 2002 b y c), sobre todo cuando la disponibilidad de agua es alta y las temperaturas bajas. Por ello suelen estar involucradas en el desarrollo de distintas fitopatologías, concretamente son los causantes de los marchitamientos vasculares (fusariosis

vascular), de las podredumbres de cuello y raíces, y los mohos amarillos y rosados de las enfermedades de poscosecha.

Marchitamientos vasculares

En general, los marchitamientos vasculares son enfermedades típicas del suelo y son muy destructivas, espectaculares y alarmantes. Se manifiestan en un marchitamiento más o menos rápido, empardecimiento y muerte de hojas y vástagos, dando como resultado la muerte de la planta. Los marchitamientos se deben a la presencia y actividad del patógeno en los tejidos vasculares xilemáticos de las plantas. Generalmente, el patógeno continúa propagándose por el interior, en forma de micelio o conidios, a través de los vasos xilemáticos hasta que muere toda la planta. Mientras que la planta siga viviendo, el hongo se limita a los tejidos vasculares y a algunas células circundantes; sólo cuando la planta infectada muere, el hongo se propaga hacia otros tejidos y esporula sobre ella. Tres géneros son los causantes de los marchitamientos vasculares: *Ceratocystis*, *Fusarium* y *Verticillium* (Agrios, 1999).

➤ Fusariosis vascular

Como se dijo anteriormente, esta enfermedad afecta y ocasiona pérdidas considerables en la mayoría de las flores y hortalizas anuales, plantas de ornato, árboles de sombra y plantas de cultivo (algodón, tabaco, plátano, llantén, café, caña de azúcar, tomate, etc.). La mayoría de los hongos de este género pertenecen a la especie *Fusarium oxysporum* y, según el huésped que infecta nos encontramos con distintas formas especiales (f.sp.) dentro de una especie. Así el hongo que ataca al tomate se designa *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*; el de las cucurbitáceas *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*; el de la col *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*; el del plátano *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*; el del algodón *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*; el del clavel *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthii*; el del gladiolo *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*, etc (Agrios, 1999). En la rizosfera hay una competencia intensa con otros microorganismos y en particular con otros *Fusarium*; aunque muchas cepas de *F. oxysporum* son capaces de penetrar en los tejidos corticales de la raíz, las cepas

específicas del huésped son la únicas que penetran hasta el tejido vascular y causan la fusariosis.

Fusarium es un hongo que vive en el suelo e hiberna en él o entre los restos vegetales, en forma de micelio o esporas (clamidosporas). Se propaga a cortas distancias a través del agua del suelo y el equipo agrícola contaminado, y a grandes distancias por los trasplantes infectados o por el suelo que va en ellos. Es frecuente que una vez se haya instalado en un área se mantenga así por tiempo indefinido. Las marchiteces son más comunes y destructivas en las regiones templadas más cálidas y son menos dañinas en climas templados fríos; excepto en los cultivos de invernadero de esas áreas (Agrios, 1999).

La temperatura del suelo y del aire son unos factores ambientales extremadamente importante en el desarrollo y la agresividad de la enfermedad; la temperatura óptima del suelo para que se desarrolle es de unos 28°C, y los síntomas en la parte aérea son más graves y rápidos cuando la temperatura del aire es también de 28°C (Smith y col, 1992).

La mayoría de las marchiteces causadas por *Fusarium oxysporum* comparten un desarrollo y ciclo patológico similar. En la Figura 17 se describe, como modelo de la enfermedad, la fusariosis del tomate.

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* sólo infecta al tomate y es una de las enfermedades más persistentes y dañinas, siempre que se cultive de forma extensiva. La enfermedad es más grave en climas cálidos. Además, puede ocasionar pérdidas considerables, especialmente en aquellas variedades susceptibles donde las condiciones climáticas son favorables, por ello la disponibilidad de cultivares resistentes mantiene las pérdidas a un nivel bastante bajo.

Esta enfermedad se caracteriza por el achaparramiento de las plantas, las cuales en poco tiempo se marchitan y finalmente mueren. A veces, campos enteros de tomates son destruidos o severamente dañados antes de que puedan ser recolectados. Sin embargo, por lo general, la enfermedad no ocasiona daños graves, a menos que las temperaturas del suelo y del aire sean muy altas.

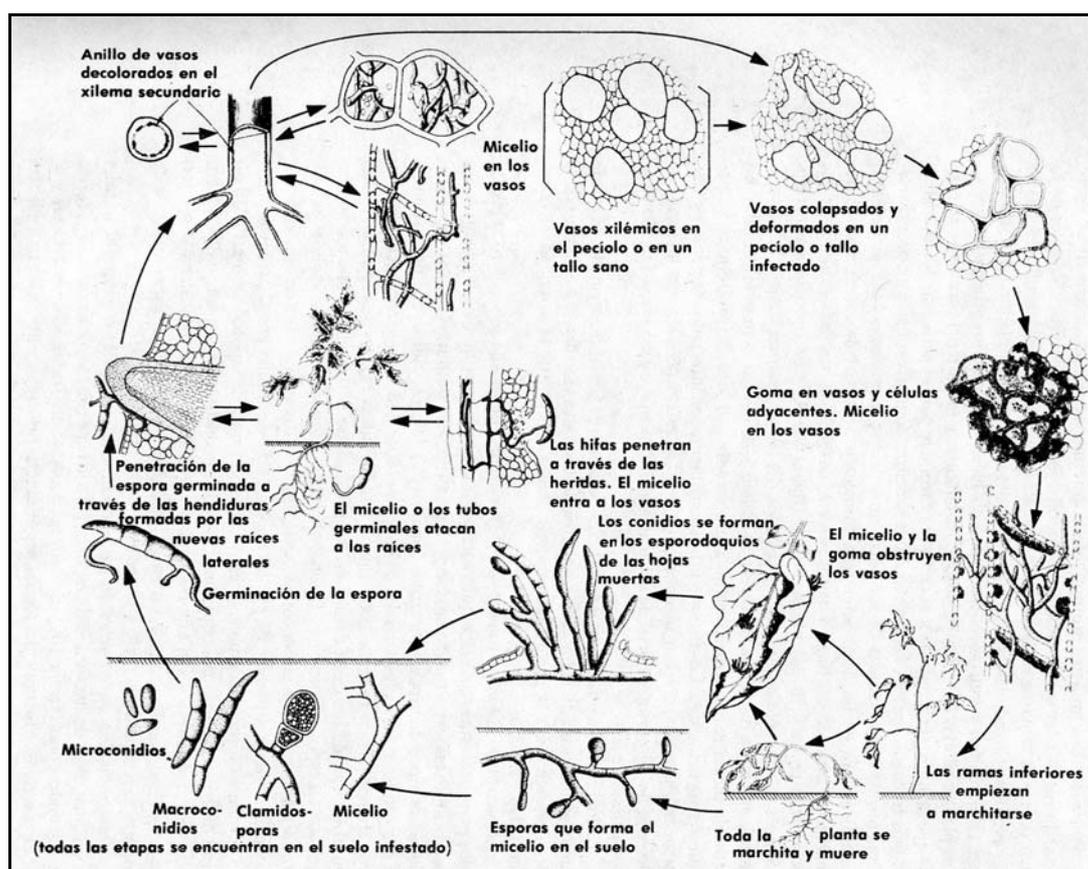


Figura 17: Ciclo patológico de la fusariosis del tomate (Agrios, 1999)

Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan en un leve aclarado de venas de los folíolos jóvenes más externos, después ocurre la epinastia ocasionada por el debilitamiento de los peciolo. Cuando las plantas son infectadas en la etapa de plántula, es frecuente que se marchiten y mueran poco después de haber aparecido los primeros síntomas. En plantas adultas lo más frecuente es que ocurra una epinastia foliar y un aclaramiento previo de las nervaduras de sus hojas antes de que se produzca el achaparramiento, amarillamiento de las hojas inferiores, formación ocasional de raíces adventicias, marchitamiento de sus hojas y tallos jóvenes, defoliación, necrosis marginal de sus hojas persistentes y, finalmente, su muerte.

Los frutos que son infectados se pudren y desprenden sin que aparezcan manchas en ellos. Las raíces también son infectadas y después de un período inicial de achaparramiento se pudren las raíces laterales más pequeñas.

Cuando las plantas sanas se desarrollan en un suelo contaminado, las esporas germinadas o el micelio penetran por la zona de elongación de la raíz, a través de heridas o a nivel de la zona donde se forman las raíces laterales. El micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos xilemáticos, entra en ellos a través de las punteaduras. En cortes transversales de la base del tallo infectado, puede verse un ennegrecimiento del sistema vascular.

En ocasiones, principalmente cuando la humedad del suelo es alta y la temperatura relativamente baja, el hongo llega a los frutos de las plantas infectadas y penetra o contamina a las semillas.

El uso de variedades de tomate resistentes al hongo puede contribuir al control de la enfermedad en el campo. El hongo se encuentra tan ampliamente distribuido y es tan persistente en los suelos que la rotación de cultivos y la esterilización de los semilleros, aun siendo métodos seguros, tienen un valor limitado. La esterilización del suelo en el campo es demasiado cara, pero siempre debe practicarse cuando se cultive en el invernadero. La aplicación de plaguicidas durante el desarrollo de la planta no es rentable y no da un buen control de la enfermedad. La solarización del terreno cubriéndolo con una película de plástico transparente, durante el verano, disminuye también la incidencia de la enfermedad. Aunque sean prometedores estos tratamientos, hasta ahora ninguno de esos métodos llega a controlar eficientemente los marchitamientos vasculares por *Fusarium* (Agrios, 1999).

Podredumbres de cuello y raíces

Muchos Ascomicetos atacan a las raíces y a la parte inferior del tallo de las plantas. Los más importantes son *Cochliobolus*, *Gibberella* y *Gaeumannomyces*, pero en la mayoría de los casos, la enfermedad se debe estrictamente a las etapas asexuales de los mismos; es decir especies de *Bipolaris* en el caso de *Cochliobolus* y especies de *Fusarium* respecto a *Gibberella*.

Distintas especies de *Fusarium*, sobre todo *F. solani* y sus f.sp., así como algunas f.sp. de *F. oxysporum*, producen, en vez de fusariosis vascular, la podredumbre

de semillas y plántulas (ahogamiento), podredumbres de raíces, del cuello del tallo, de cormos, bulbos, tubérculos, etc.

- Podredumbres de raíces: En plantas jóvenes de guisantes, cacahuete, soja, espárragos, tomate, etc., las raíces principales muestran al principio una mancha rojiza que más tarde cambia a rojo oscuro o pardo, y que se extiende hasta cubrir toda la raíz y la porción del tallo que se encuentra por debajo de la superficie del suelo, o bien aparecen rayas que se extienden por arriba de ella. En la raíz principal aparecen fisuras y las pequeñas raíces laterales son destruidas. En general el crecimiento de la planta se retrasa y las hojas se vuelven amarillas y caen. En ocasiones, si las condiciones climáticas son las idóneas, la planta puede llegar a recuperarse y producir una cosecha bastante buena; aunque en la mayoría de los casos mueren (Agrios, 1999). Esta enfermedad se ve favorecida por temperaturas bajas (18-20°C), pero el estrés hídrico y térmico sufrido por las raíces también influyen en la enfermedad (Aparicio-Salmerón y col., 1991).

- Podredumbre del cuello: En las plantas infectadas por *Fusarium*, éstas se marchitan y mueren debido a que la base del tallo (cuello) se pudre. Las lesiones aparecen en el tallo a nivel de la superficie del suelo o por debajo de ella, a modo de manchas rojas o de color rosa, y en ocasiones se observa un chancro oscuro. Estas lesiones se producen de fuera hacia adentro, y es frecuente que no afecten a la parte interna del tallo, aunque a veces, en secciones longitudinales del tallo, se aprecia necrosis vascular desde la base hasta unos 50 cm como máximo, y parte de la médula oscura (Agrios, 1999; Aparicio-Salmerón y col., 1991).

- Podredumbre de bulbos, cormos y tubérculos: Se produce tanto en el campo como durante el almacenamiento. Son enfermedades comunes de plantas tales como cebolla, lirio, gladiolo, etc. La podredumbre puede iniciarse en las superficies sanas de los bulbos, cormos o tubérculos, pero también, en las heridas, en la base de esos órganos, en el follaje, en las raíces dañadas y enfermas, o en las incisiones que se producen en los tejidos después de

cosecharlos. A simple vista pueden no mostrar los síntomas de la enfermedad, pero la placa basal y las escamas carnosas, así como las raíces adquieren un color de café oscuro a negro, que se hunde y pudre al contener masas del micelio del hongo. La podredumbre suele ser seca y firme. Las hojas de las plantas se vuelven amarillas, después adquieren color púrpura o café y mueren prematuramente. En los tubérculos aparecen pequeñas manchas café que en poco tiempo se extienden y hundén. Finalmente, porciones del tubérculo o todo éste son destruidas por el hongo y se transforma en una masa dura y momificada, a menos que estén húmedas y sean invadidas por las bacterias de las podredumbres blandas (Agrios, 1999).

Enfermedades de poscosecha

El género *Fusarium* produce los “mohos amarillos o rosados” en plantas de ornato y hortalizas. En naranjas y limones, que se almacenan durante mucho tiempo, ocasiona la podredumbre café.

En la mayoría de los casos la contaminación se produce en el campo antes o durante la cosecha, aunque también puede desarrollarse en el transcurso del almacenamiento. Al principio, los tejidos afectados se ablandan y, a medida que se extiende la infección, las áreas putrefactas se hundén y aparece sobre ellas un penacho de pelo blanquecino, rosa o amarillento del moho. En el caso del tomate y cucurbitáceas, la infección se desarrolla con mayor rapidez (Agrios, 1999).

1.6.2.1.- Control de las enfermedades causadas por *Fusarium*

En general, el control de las enfermedades originadas por *Fusarium* se realiza mediante métodos preventivos y técnicas de cultivo: esterilización del suelo, semillas y órganos de propagación sanos o resistentes a la enfermedad, sustratos exentos del patógeno, etc. Sin embargo, las esporas llevadas por el viento permiten que el hongo se establezca de nuevo en el suelo, y para eliminarlo sea necesario el uso de fungicidas.

Durante el cultivo no existe ningún método de control que permita controlar eficazmente la enfermedad. Así, el ablandamiento de los suelos compactos, la rotación de cultivos evitando aquellos que sean susceptibles y la solarización ayudan a disminuir las pérdidas. Los tratamientos químicos son poco eficaces, además de ser drásticos y costosos, y sólo se justifican en condiciones muy concretas de enfermedad, puesto que implican la desinfección del suelo (Aparicio-Salmerón y col., 1991).

El control de las enfermedades de poscosecha debe iniciarse en el campo controlando a los patógenos, para evitar que la cosecha se contamine al ser recolectada y almacenada. Por ello los productos han de recogerse, manipularse y almacenarse cuidadosamente para que no se produzcan heridas, golpes y otros daños que puedan servir de entrada al patógeno. Además, el factor más importante a tener en cuenta son las condiciones de almacenamiento, ya que de ellas dependerá que no se produzcan nuevas infecciones ni se desarrollen las ya existentes.

En los últimos años se ha llevado a cabo un gran número de investigaciones en torno al control biológico de la fusariosis vascular, por lo que éste debería ser incorporado en los programas de control integrado. Los resultados son alentadores y diferentes agentes han demostrado poder controlar la enfermedad, como por ejemplo el uso de formas especiales (f.sp.) de *F. oxysporum* que no son patógenas para el cultivo (Abbattista Gentile y col., 1988; Davis, 1968; Jarvis, 1998; Larkin y Fravel, 1998; Tamietti y col., 1993), bacterias del género *Pseudomonas* que producen sideróforos (Agrios, 1999; Fuchs y Défago, 1991; Lemanceau y Alabouvette, 1993), la inducción de resistencia (Abbattista Gentile y col., 1988; Jarvis, 1998; Lemanceau y Alabouvette, 1993; Tamietti y col., 1993), y el uso de hongos antagonistas específicos de suelos supresores, como el género *Penicillium* y *Trichoderma*, y concretamente *P. oxalicum* (De Cal, 1997 a, 1999) y *T. harzianum* (Aparicio-Salmerón y col., 1991; Jarvis, 1998; Marois y Mitchell, 1981 a y b).

El importante papel que desempeña el género *Penicillium* en el control de la fusariosis ha sido ampliamente expuesto en el apartado dedicado a este prometedor agente de biocontrol (Apartado 1.3. 4).

Las especies del género *Trichoderma* también han demostrado poder controlar las enfermedades causadas por las distintas f.sp. de *Fusarium oxysporum*. Así diversos estudios “*in vitro*”, en invernadero como en campo, y en los que se utiliza, como agente de control, a las especies de *Trichoderma*, entre ellas *T. harzianum*, bien solas o conjuntamente con otros agentes de control (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium*, etc), o bien combinándolas con distintos fungicidas, demuestran que son capaces de controlar la fusariosis vascular del tomate (Amadioha, 1999; Kurzwinska y Pacyna, 2000; Larkin y Fravel, 1998; Niknejad-Kazempour y col., 2000; Sarhan y col., 2000; Sabet y col., 2000), del sésamo (Karunanithi y Usman, 1999), del *Cajanus cajan* (Biswas, 1999; Pandey y Upadhyay, 1999 y 2000), del garbanzo (Hervas y col., 1998), del clavel (Pinzón y col., 1999; Weber y col., 1998 y 2000), de la esparraguera (Weber y col., 1998 y 2000), y del ricino (Pushpavathi y col., 1998); los marchitamientos vasculares y podredumbre del cuello de los pepinos (Hamed, 1999), los marchitamientos vasculares y podredumbre de la raíz de la alfalfa (Hassanein y col., 2000), y los marchitamientos vasculares y podredumbre del corno del gladiolo (Mishra y col., 2000); la podredumbre del rizoma del jengibre (Sharma, 1998), la podredumbre del bulbo de cebolla (Rajendran y Ranganatham, 1996), la podredumbre de la raíz de las judías (Estévez de Jensen y col., 2002), y la podredumbre de la soja (Rajeev-Pant y Mukhopadhyay, 2001).

Además, Antal y col. (2000), Godwin y Arinzae (2001), Inglis y Kawchuk (2002), Rajeev y Mukhopadhyay (2001) y Sarhan y col. (2000) en sus trabajos nos confirman que los mecanismos de control que utiliza *Trichoderma* frente a *Fusarium* son la antibiosis, la competencia y el micoparasitismo.

1.7.- *Verticillium dahliae* Kleb.

1.7.1.- Caracteres morfológicos y culturales

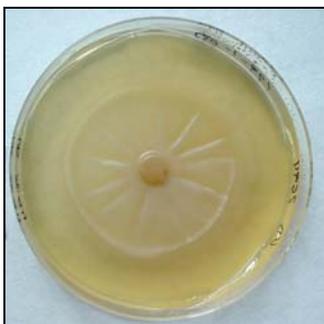


Figura 18: Aspecto de la colonia de *V. dahliae* crecida en PDA.

La especie *Verticillium dahliae* se caracteriza principalmente por presentar un crecimiento muy lento, unos 2.5 cm de diámetro en 10 días a 25°C. Las colonias, de color translucido, crecen muy adheridas al sustrato y presentan un aspecto compacto con surcos radiales, y con escaso crecimiento aéreo (Figura 18).

Sus conidióforos son hialinos y están ramificados verticalmente (Figura 19). Los conidios también son hialinos, de elipsoides a subcilíndricos, principalmente unicelulares (Figuras 20). Además, forma microesclerocios hialinos, de color pardo oscuro o negro. No se conoce estado teleomorfo (Smith y col., 1992).



Figura 19: Hifa conidiógena de *V. dahliae* (400 X).

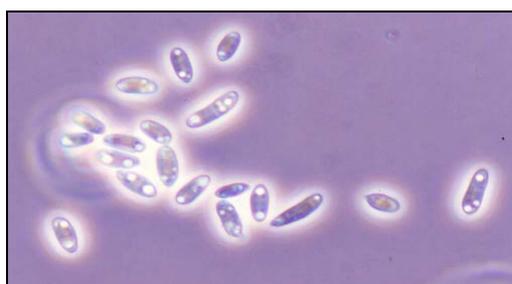


Figura 20: Conidios hialinos de *V. dahliae* (1000 X).

Ecología

Verticillium dahliae es un hongo patógeno de plantas que habita en el suelo de donde ha sido aislado. Además, se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, principalmente en zonas templadas y subtropicales (Smith y col., 1992).

1.7.2.- Enfermedades causadas por *Verticillium*

El género *Verticillium* ocasiona los marchitamientos vasculares y produce pérdidas importantes en la mayoría de plantas de ornato (crisantemo, aster, dalia), hortalizas (tomate, berenjena, pimiento, melón), cultivos (patata, algodón, alfalfa), frutales de hueso (albaricoque, cerezo), árboles forestales y de sombra (arce, olmo), etc.

Dos especies de éste género, *Verticillium albo-atrum* y *V. dahliae*, son los causantes de los marchitamientos por *Verticillium*. Algunas cepas presentan especialización por su hospedante, pero la mayoría atacan a una amplia gama de plantas. Además, ambas especies hibernan en el suelo, dentro de los hospedantes perennes, en los órganos de reproducción vegetativa o en restos de vegetales, y lo hacen en forma de micelio o microesclerocios (Agrios, 1999).

Los microesclerocios son capaces de soportar condiciones ambientales adversas y de sobrevivir durante más de 12–14 años; además hay otros factores, como la densidad y el potencial del inóculo, de los que depende también la magnitud de la epidemia.

Hay pocos datos sobre especialización de huéspedes, aunque se ha visto que los aislados de un huésped pueden causar enfermedad en algunos cultivos o infectar a otros sin que se desarrollen síntomas de enfermedad, es decir son portadores asintomáticos (Smith y col., 1992).

Marchitamientos vasculares

Los marchitamientos vasculares por *Verticillium* (verticilosis) se desarrollan en general de forma acrópeta y se acompañan por una clorosis marginal o intervenal, empardecimiento de hojas y vástagos, defoliación, achaparramiento de la planta y cambio de coloración en los haces vasculares. Si la infección es muy grave las plantas mueren prematuramente (Agrios, 1999; Smith y col., 1992).

La marchitez por *Verticillium* se considera una enfermedad monocíclica ya que el inóculo raras veces produce nuevo inóculo eficaz dentro del mismo período de crecimiento. La temperatura del suelo y del aire afecta de forma crítica al desarrollo de la enfermedad; principalmente, es la temperatura del suelo la determinante de la infección. Aparecerán síntomas marcados cuando la temperatura del suelo oscile entre 20-24 °C. Además, el riego o el agua de lluvia, afecta negativamente a la capacidad del huésped para sobreponerse a la enfermedad, al disminuir la temperatura e incrementar la disponibilidad de agua en el suelo durante las estaciones cálidas.

La dispersión de los propágulos tiene lugar a través del viento, agua de riego, restos de plantas enfermas (incluyendo malas hierbas), o partículas de suelo adheridas a la maquinaria o herramientas agrícolas; también se atribuye un papel importante en la diseminación del patógeno al material de propagación enfermo (estaquillas, tubérculos). De momento la transmisión por semilla se limita a la alfalfa, cártamo, girasol y algodón (Smith y col., 1992).

Los síntomas de marchitez por *Verticillium* son similares a los que ocasiona *Fusarium* y en los hospedantes afectados por ambos géneros es imposible diferenciarlos. Sin embargo, *Verticillium* induce marchitez a temperaturas más bajas que *Fusarium* y los síntomas se desarrollan más lentamente.

En el caso del algodón, la enfermedad se desarrolla principalmente en las plántulas, las cuales mueren poco después de ser infectadas. Cuando la infección es más tardía ocasiona epinastia en hojas superiores, seguida por la aparición de manchas cloróticas irregulares que después se vuelven necróticas. Las plantas adultas sufren

distintos grados de achaparramiento y sus tejidos vasculares muestran una decoloración característica. En algunos huéspedes, la infección da como resultado la defoliación, marchitez gradual, muerte de ramas o un colapso repentino, y finalmente la muerte de la planta (Agrios, 1999).

La primera vez que se manifiestan los síntomas de la enfermedad en un campo son leves y locales, pero en años sucesivos, los ataques son cada vez más severos y abarcan mayor superficie; a no ser que las plantas dejen de cultivarse o sean sustituidas por variedades resistentes. Esta severidad cada vez mayor de la enfermedad año tras año, se debe al incremento, también cada vez mayor, del inóculo presente, así como a la aparición de cepas más virulentas (Agrios, 1999).

Las hifas infectivas formadas a partir de los propágulos penetran a través de las raíces o raicillas intactas, por los puntos de emergencia de las raíces laterales o por las heridas debidas a nematodos o a prácticas culturales (Mace y col., 1981).

El hongo avanza inter o intracelularmente a través de la epidermis, cortex y endodermis, hasta alcanzar el xilema y sin causar daños visibles de podredumbre de raíz. Después el hongo se limita al lumen de los vasos y produce conidios que se transportan hacia arriba por el flujo de transpiración, formando nuevas colonias. Sólo en los últimos estadios de la enfermedad hay un crecimiento sustancial del hongo fuera de los tejidos vasculares (Smith y col., 1992).

Una respuesta frecuente del huésped es la formación de tílides (invaginaciones de las células parenquimáticas adyacentes en los vasos xilemáticos). Otras reacciones son la formación y deposición de geles, que se atribuyen normalmente a la acción de varios enzimas hidrolíticos, así como a la oxidación y polimerización de compuestos fenólicos que conllevan a la deposición de melanina y a la aparición de cambios de coloración de los vasos (Bishop y Cooper, 1983).

1.7.2.1.- Control de enfermedades causadas por *Verticillium*

Existe una literatura voluminosa sobre las marchiteces ocasionadas por *Verticillium*, pero el problema de su control sigue sin resolverse. Resulta evidente que el objetivo de las medidas de control debe ser el agente patógeno antes de infectar y establecerse en el huésped, por tanto, debe prestarse una atención especial a los factores que afectan a la supervivencia del hongo en el suelo.

La reducción del inóculo del patógeno o su desarrollo en los tejidos del huésped es mejor realizarla a través de la integración de diversos medios de lucha. El medio más económico de controlar las enfermedades es a través de la modificación de las prácticas culturales y el uso de cultivares resistentes o tolerantes. El control químico, cuando es posible su aplicación, es en general caro, de ahí que su uso esté restringido como último recurso cuando otros medios son inadecuados, y aun así debe sopesarse frente al coste de pérdidas por la enfermedad. El control biológico puede ser menos costoso a la larga y, seguramente, será el sustituto del control químico en el futuro, puesto que aún no está completamente desarrollado para su aplicación comercial.

El desarrollo de fungicidas que se distribuyan uniformemente moviéndose basípetamente en los vasos, podría proteger a los huéspedes susceptibles contra infecciones consecutivas. También deberían buscarse y ensayarse productos que intervengan a nivel de la formación de microesclerocios en los restos vegetales (Smith y col., 1992).

En general, el control de los marchitamientos por *Verticillium* se basa en el uso de plantas sanas en suelos libres de la enfermedad, en el uso de variedades resistentes y evitando la siembra de cultivos susceptibles donde se han cultivado solanáceas en varias ocasiones. La solarización del suelo ha demostrado ser útil en regiones con temperaturas altas en verano y con poca precipitación como California e Israel. La fumigación del suelo puede ser otra alternativa, cuando se quiera proteger cultivos de gran valor; aunque deberían buscarse otros métodos de control menos agresivos para el medio ambiente (Agrios, 1999).

Por último, se considera extremadamente importante la mejora y/o selección de nuevos cultivares, híbridos o patrones resistentes, así como la investigación de hongos antagonistas como *Talaromyces flavus* y las especies de *Trichoderma* que pueden ser una opción añadida para el control integrado de las enfermedades causadas por *Verticillium* (Smith y col., 1992).

Existen pocos estudios sobre el control biológico de *Verticillium* si lo comparamos con el volumen de información que existe sobre los daños que produce el género *Verticillium*. No obstante se ha demostrado, en estudios “*in vitro*”, que las especies de *Trichoderma*, entre ellas *T. harzianum*, son capaces de inhibir el crecimiento de *Verticillium*, por la producción de metabolitos, tanto volátiles como no volátiles, y por medio del hiperparasitismo, mecanismo de acción que caracteriza a las especies del género *Trichoderma* (Alstrom, 2000; Altomare y Bottalico, 1992; Georgieva, 1992; Gherbawy y Prillinger, 2000; Hanson, 2000; Huang, 2001; Kowalik, 1997; Kurzawinska y Pacyna, 2000; Martins y De Melo, 1998; Smith y col., 1992).

2.- OBJETIVOS

El presente trabajo se enmarca dentro de la Línea genérica “Detección de organismos/productos fúngicos con actividades biológicas”, que el grupo de investigación que lleva por nombre “Mohos y Metabolitos Secundarios Fúngicos”, de la Unidad Docente de Biología Vegetal (Área Botánica) de la Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología de la Universidad Politécnica de Valencia, viene desarrollando desde 1994. Este trabajo constituye, dentro de la Línea de Investigación, una etapa más en el tipo de investigaciones que se están llevando a cabo, y cuyo objetivo final es la obtención de un organismo/sustancia de interés para el desarrollo de una agricultura más respetuosa con el medio ambiente, capaz de controlar a los agentes patógenos que causan enfermedades en los cultivos y en los productos de poscosecha.

Concretamente, el objetivo principal del trabajo es estudiar el comportamiento de las cepas *Penicillium oxalicum* Currie and Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai, con el fin de evaluar su capacidad para competir y dominar bajo determinadas condiciones ambientales de actividad de agua (a_w) y de temperatura (T), cuando se enfrentan a distintas cepas fitopatógenas: *Rhizoctonia solani* CETC 2819, *Verticillium dahliae* CECT 2694, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2866, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* CECT 2867 y *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* CECT 2868.

Este objetivo se pretende conseguir a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar el comportamiento de los agentes de biocontrol, *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma harzianum*, en agar patata glucosada (PDA).
2. Estudiar el comportamiento de las cepas fitopatógenas, *Rhizoctonia solani* cepa 2819, *Verticillium dahliae* cepa 2694, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* cepas 2715 y 2866, y *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* cepas 2867 y 2868, en agar patata glucosada (PDA).

3. Evaluar la influencia de los factores ambientales, actividad de agua y temperatura, en las interacciones formadas entre *Penicillium oxalicum* y las cuatro cepas de *Fusarium oxysporum*, en PDA, al enfrentarlas dos a dos.

4. Evaluar la influencia de los factores ambientales, actividad de agua y temperatura, en las interacciones formadas entre *Trichoderma harzianum*-*Rhizoctonia solani*; *Trichoderma harzianum*-*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Trichoderma harzianum*-*Verticillium dahliae*, sobre PDA, al enfrentarlas dos a dos.

5. Determinar si existe correlación entre la velocidad de crecimiento, de cada una de las cepas objeto de este estudio, y el Índice de Dominancia (I_D), de cada una de ellas, en las interacciones interespecíficas estudiadas.

3.- PLAN DE TRABAJO

Para alcanzar los objetivos especificados, se han seguido las siguientes etapas:

1. Revisión bibliográfica de las investigaciones realizadas con *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma harzianum*.
2. Revisión bibliográfica de las cepas *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* y *Verticillium dahliae*.
3. Elección de las cepas base para el trabajo.
4. Estudio de la influencia de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento de las cepas fúngicas.
 - Siembra de las cepas sobre medio PDA (Agar Patata Glucosada) con la actividad de agua ajustada a 0.85, 0.90, 0.95, 0.98 y 0.995. Incubación a las temperaturas de 15 y 25°C.
 - Obtención de resultados y estimación de las velocidades de crecimiento en las diferentes condiciones ensayadas.
 - Representación gráfica de los valores obtenidos de la velocidad de crecimiento para cada especie fúngica.
 - Análisis estadístico de los resultados.
 - Obtención de conclusiones.
5. Estudio del efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre las interacciones entre *Penicillium oxalicum* y cuatro cepas de *Fusarium oxysporum* diferentes:

-
- Siembra de las colonias, dos a dos, sobre medio PDA con la actividad de agua ajustada a 0.85, 0.90, 0.95, 0.98 y 0.995. Incubación a las temperaturas de 15 y 25°C.
 - Obtención de resultados y estimación de las velocidades de crecimiento en las diferentes condiciones ensayadas.
 - Representación gráfica de los valores obtenidos de la velocidad de crecimiento para cada especie fúngica.
 - Análisis estadístico de los resultados.
 - Observación macroscópica del tipo de interacción entre las cepas sembradas dos a dos, en todas las condiciones del experimento.
 - Obtención de resultados y cálculo del Índice de Dominancia para cada especie y condición ensayada.
 - Representación gráfica de los resultados obtenidos del Índice de Dominancia.
 - Obtención de conclusiones.
6. Estudio del efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre las interacciones *Trichoderma harzianum*-*Rhizoctonia solani*; *Trichoderma harzianum*-*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Trichoderma harzianum*-*Verticillium dahliae*:
- Siembra de las colonias, dos a dos, en medio PDA con la actividad de agua ajustada a 0.85, 0.90, 0.95, 0.98 y 0.995. Incubación a las temperaturas de 15 y 25°C.
 - Obtención de resultados y estimación de las velocidades de crecimiento en las diferentes condiciones ensayadas.

- Representación gráfica de los valores obtenidos de la velocidad de crecimiento para cada especie fúngica.
- Análisis estadístico de los resultados.
- Observación macroscópica del tipo de interacción entre las cepas sembradas dos a dos, en todas las condiciones del experimento.
- Obtención de resultados y cálculo del Índice de Dominancia para cada especie y condición ensayada.
- Representación gráfica de los resultados obtenidos del Índice de Dominancia.
- Obtención de conclusiones.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Material

4.1.1.- Microorganismos

Las especies utilizadas para llevar a cabo este trabajo son *Penicillium oxalicum* Currie and Thom LBVB 1001, *Trichoderma harzianum* Rifai LBVB 1010, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* cepas 2715 y 2866, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* cepas 2867 y 2868, *Rhizoctonia solani* Kuhn CECT 2819, y *Verticillium dahliae* Kleb. CECT 2694.

Las cepas *Penicillium oxalicum* (PO) y *Trichoderma harzianum* (TH), fueron aisladas en el laboratorio de Biología Vegetal, de la E.T.S. del Medio Rural y Enología de la Universidad Politécnica de Valencia, a partir de una muestra de maíz nacional procedente de un almacén de grano de la ciudad de Valencia en el año 1994 (Tabla 2). Las dos cepas fueron seleccionadas, de entre un total de 70 cepas aisladas de distintas muestras de cereales, por presentar un fuerte potencial para inhibir el crecimiento de bacterias, hongos fitopatógenos y hongos productores de micotoxinas (García Breijo y col., 2001; Giménez y col., 2000; Santamarina y col., 2000, 2001 y 2002 a).

Las restantes cepas: *Rhizoctonia solani* (RS), *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* cepas 2715 (FOL1) y 2866 (FOL2), *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* cepas 2867 (FOG1) y 2868 (FOG2), y *Verticillium dahliae* (VD), fueron suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Se eligieron por haber sido aisladas de plantas de interés agrícola y/o jardinería y causantes de enfermedades en los cultivos, así como por no estar reseñadas en la CECT como productoras de micotoxinas (Tabla 2).

Todas las cepas fueron mantenidas en Agar Patata Glucosada (PDA) y se realizaron cultivos periódicos de las mismas.

Tabla 2: Cepas utilizadas en los estudios ecofisiológicos.

CEPA	REFERENCIA	AISLADA
<i>Penicillium oxalicum</i> (PO)	LBVB 1001	Semilla de Maíz
<i>Trichoderma harzianum</i> (TH)	LBVB 1010	Semilla de Maíz
<i>Rhizoctonia solani</i> (RS)	CECT 2819	Raíz de Algodón
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (FOL1)	CECT 2715	Planta de Tomate
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (FOL2)	CECT 2866	Planta de Tomate
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i> (FOG1)	CECT 2867	Cormo de Gladiolo
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i> (FOG2)	CECT 2868	Cormo de Gladiolo
<i>Verticillium dahliae</i> (VD)	CECT 2694	Planta de Tomate

4.2.- Métodos

4.2.1.- Medios de cultivo

Los medios de cultivo son la base fundamental para cualquier estudio que requiera el uso de microorganismos, al permitir el crecimiento de los mismos en condiciones controladas y poder mantenerlos en estado puro. Los microorganismos para crecer deben tomar del ambiente todas las sustancias que necesitan para la síntesis de sus compuestos celulares y para la generación de energía. Por tanto, un medio de cultivo debe contener todos los nutrientes necesarios, en cantidades apropiadas a los requerimientos específicos de cada microorganismo, que permitan y favorezcan un buen crecimiento de los mismos.

4.2.1.1. – Medio PDA (Agar patata glucosada)

Patata	200 g
Agar	20 g
Glucosa	20 g
Agua destilada	1000 ml

Se hierven 200 g de patatas peladas y troceadas, en pequeños trozos, en un litro de agua destilada durante una hora. El caldo se filtra y se completa el filtrado, con agua destilada, hasta un litro. Se añade la glucosa y se ajusta el pH a 5.5. Por último se agrega el agar y se esteriliza a 121°C durante 20 minutos.

4.2.1.2.- Extracto de patata (EP)

Patata	1000 g
Agua destilada	1000 ml

Se hierve 1 kg de patatas peladas y cortadas, en pequeños trozos, en un litro de agua destilada durante una hora. Después se filtra el caldo y se completa el filtrado hasta un litro con agua destilada. Se guarda congelado hasta su utilización.

4.2.1.3. -Medio PDA con la actividad de agua (a_w) modificada con glicerol

EP	20 ml
Glucosa	2 g
Agar	1.2 g
Glicerol	X g
Agua destilada	Y ml

La cantidad X de glicerol se obtiene a partir de la Figura X y la cantidad Y de agua destilada se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$Y \text{ ml de agua destilada} / 100 \text{ ml de medio} = 80 \text{ ml} - X \text{ g de glicerol} / \rho$$

Donde ρ es la densidad del glicerol (1.26 g/cm³)

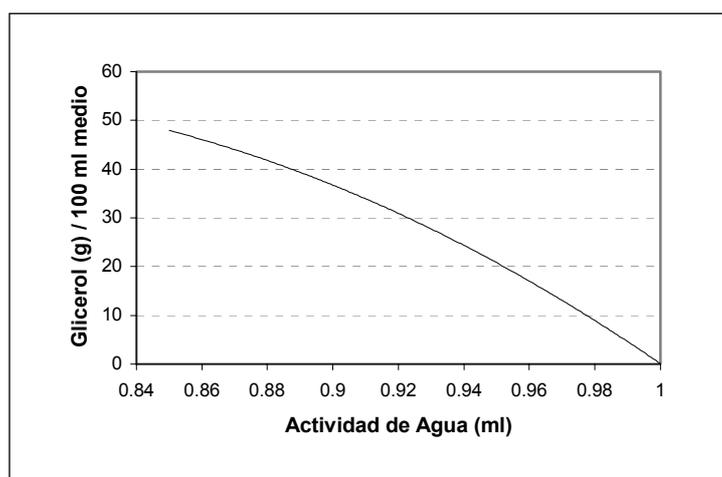


Figura 21: Relación entre la actividad de agua del medio y la cantidad de glicerol necesaria para obtenerla.

En la Tabla 3 se indican los gramos de glicerol y el volumen de agua que se necesitan para preparar 100 ml de medio con la a_w ajustada a: 0.995, 0.98, 0.95, 0.90 y 0.85.

Tabla 3: Cantidad de glicerol y de agua destilada que se necesitan para preparar 100 ml de medio en función de la actividad del agua (a_w).

a_w	glicerol (g)	agua (ml)
0.995	0.0	80.00
0.98	9.5	72.46
0.95	21.0	63.33
0.90	36.5	51.03
0.85	48.0	41.90

Para preparar el medio se mezclan todos los compuestos excepto el agar y se ajusta el pH a 5.5. Después se añade el agar y se esteriliza a 121°C durante 20 minutos. El medio, una vez estéril, se reparte asépticamente en placas Petri a razón de 20 ml por placa.

4.2.2.- Condiciones del experimento

En todas las experiencias se realizaron 10 tratamientos en los que se combinaron 5 actividades de agua (0.85, 0.90, 0.95, 0.98 y 0.995) y 2 temperaturas (15 y 25°C). Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Los pasos en cada experiencia son los que se detallan a continuación:

1. Siembra en placas con PDA de la especie fúngica a estudiar (PO, TH, RS, FOL1, FOL2, FOG1, FOG2 y VD) a partir de un cultivo puro.
2. Incubación a 25°C durante 5 días.
3. Obtención de discos, de la zona periférica de las colonias, con un diámetro de 8 mm.
4. Siembra de los discos en placas conteniendo el medio de cultivo PDA con la a_w ajustada (apartado 4.2.1.3.). Los discos se depositan de forma que el agar del mismo esté en contacto con el de la placa.

4.1. Crecimiento individual: el disco se inocula en el centro de la placa. En la Tabla 4 se indican las condiciones de las experiencias para cada cepa ensayada.

4.2. Crecimiento dual: los discos se enfrentan dos a dos a una distancia de 4.5 cm entre los puntos de inoculación. En la Tabla 5 se especifican las condiciones utilizadas en las interacciones interespecíficas.

5. Las placas de una misma a_w , se guardan en cajas herméticas de polietileno.
6. Incubación a dos temperaturas distintas: 15 y 25°C.

Tabla 4: Condiciones de las experiencias del crecimiento individual de cada cepa ensayada a 15 y 25°C.

a_w				
0.995	0.98	0.95	0.90	0.85
PO	PO	PO	PO	PO
TH	TH	TH	TH	TH
RS	RS	RS	RS	RS
FOL1	FOL1	FOL1	FOL1	FOL1
FOL2	FOL2	FOL2	FOL2	FOL2
FOG1	FOG1	FOG1	FOG1	FOG1
FOG2	FOG2	FOG2	FOG2	FOG2
VD	VD	VD	VD	VD

Tabla 5: Condiciones de las experiencias del crecimiento dual a 15 y 25°C.

		a_w				
		0.995	0.98	0.95	0.90	0.85
PO	FOL1	FOL1	FOL1	FOL1	FOL1	FOL1
	FOL2	FOL2	FOL2	FOL2	FOL2	FOL2
	FOG1	FOG1	FOG1	FOG1	FOG1	FOG1
	FOG2	FOG2	FOG2	FOG2	FOG2	FOG2
TH	RS	RS	RS	RS	RS	RS
	FOL1	FOL1	FOL1	FOL1	FOL1	FOL1
	VD	VD	VD	VD	VD	VD

4.2.3.- Estudio de la influencia de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento de las colonias

Para cuantificar el crecimiento fúngico se utilizó el radio de la colonia fúngica sobre el medio de cultivo, aunque el parámetro que nos daría un resultado más fiable sería el peso de la colonia fúngica desarrollada, pero se ha demostrado que hay una correlación entre este parámetro y el radio de la colonia (Marín, 1994), por lo que se optó por este último al ser más fácil de obtener.

Para cada colonia se dibujaron dos radios perpendiculares entre sí por el reverso de la placa. Las medidas se realizaron diariamente o cada dos días, dependiendo del crecimiento fúngico de la especie a estudiar, pero el criterio seguido fue el mismo para toda experiencia.

A partir de los datos obtenidos se representó el crecimiento radial en función del tiempo, para cada especie fúngica ensayada y cada una de las condiciones de a_w y T. Los datos se ajustaron a una recta correspondiente a la fase de crecimiento lineal, calculándose a partir de aquí la velocidad de crecimiento en mm/día. Para el cálculo de las regresiones lineales se utilizó el programa Microsoft Excel 2000.

4.2.4.- Estudio del Tipo de Interacción e Índice de Dominancia en las interacciones fúngicas

Para el estudio del Tipo de Interacción e Índice de Dominancia (I_D) se siguió la metodología descrita por Magan y Lacey (1984).

Transcurridas unas ocho semanas desde la inoculación de las placas se procedió a la observación macroscópica de las mismas, para determinar que tipo de interacción establecían las cepas enfrentadas dos a dos.

Al Tipo de Interacción se le asigna una letra (Tabla 6) en función de si hay inhibición o no, y si la hay, si ésta se produce al contacto o a distancia y, además, si la especie inhibidora continúa creciendo a través de la colonia inhibida.

Para el cálculo de I_D (Tabla 6), a cada hongo se le asigna un valor numérico, atendiendo al Tipo de Interacción que presenta, el cual va del 1 al 5; a mayor valor numérico mayor capacidad inhibitoria posee la especie en cuestión.

Tabla 6: Tipo de interacciones, descripción y valores numéricos que les corresponden (Magan y Lacey, 1984).

TIPO DE INTERACCIÓN	DESCRIPCIÓN	VALOR NUMÉRICO
A	Crecimiento en común	1
B	Inhibición mutua por contacto o espacio entre las colonias < 2 mm	2
C	Inhibición mutua a distancia o espacio entre las colonias > 2 mm	3
D	Inhibición de un microorganismo por contacto, la especie inhibidora continúa creciendo a través de la colonia inhibida	4
E	Inhibición de un microorganismo a distancia, la especie inhibidora continúa creciendo a través de la colonia inhibida	5

En la Tabla 6 se describe el Tipo de Interacción y el valor numérico que le corresponde. En las interacciones A, B y C, a las dos especies se les asigna el mismo valor numérico, mientras que en las interacciones D y E el valor numérico es para la especie inhibidora, asignándole un cero a la especie inhibida. En los casos en los que sólo crece una de las cepas enfrentadas, a la especie que no crece se le asigna siempre un 0, independientemente del tipo de interacción.

Finalmente, se representa el Índice de Dominancia (I_D) y las ratios de crecimiento (mm/día) de cada cepa enfrentada en la interacción interespecífica para las distintas a_w y T ensayadas.

4.2.5.- Estudio estadístico

Para comprobar si existen diferencias significativas entre los crecimientos promedios de cada cepa ensayada, para las diferentes condiciones de a_w y T, se realizó el análisis estadístico de la varianza (ANOVA). Los análisis se realizaron mediante el programa estadístico STATGRAPHICS PLUS 5.0 (Statistical Graphics Corp.).

En los ensayos de crecimiento individual, las ratios de crecimiento fueron analizadas para los factores simples a_w y T, y para su interacción ($a_w \times T$). En las experiencias de crecimiento dual se analizaron los factores a_w , T, especie (E) y la interacción de dos factores: $a_w \times T$, $a_w \times E$, y T x E.

El estudio estadístico se completó con los gráficos de intervalos LSD (Least Significant Difference) de comparación de medias. Estos intervalos nos indican entre cuáles de los diferentes niveles de los factores analizados (a_w , T y E) existen diferencias significativas; puesto que el ANOVA sólo indica que al menos una de las medias difiere de las restantes, pero no precisa cuáles son las que difieren entre sí.

En los ensayos duales se representó, además, los gráficos de las interacciones $a_w \times E$ y T x E. Estos gráficos muestran las ratios de crecimiento promedio, para cada una de las combinaciones de los distintos niveles, entre los dos factores que intervienen en la interacción.

5.1.5.- *Verticillium dahliae* CECT 2694

En la Tabla 19 se muestran los resultados del crecimiento individual de la cepa VD para las diferentes condiciones ensayadas de a_w y T, mientras que en la Figura 41 se representan gráficamente esos resultados. Para su representación se han utilizado los datos obtenidos a partir del ajuste de las rectas de regresión de la Figura A-8 del Anexo A.

Tabla 19: Ratios de crecimiento (mm/día) de VD a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w).

VD	a_w				
	0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	0.00	0.00	0.00	0.74	2.05
15°C	0.00	0.00	0.00	0.46	1.48

Nuevamente, nos encontramos frente a un hongo que crece en las a_w más altas, a 0.98 y 0.995 de a_w , independientemente de la T; por lo que puede ser considerado como un hongo higrofilico (Pelhate, 1968), al estar su desarrollo fuertemente influenciado por la disponibilidad de agua del medio.

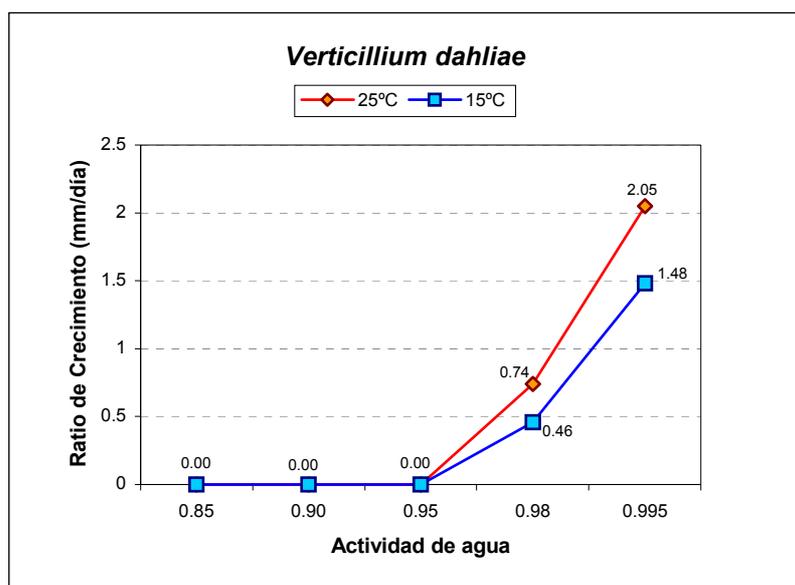


Figura 41: Velocidad de crecimiento (mm/día) de VD a las distintas a_w en función de la T.

Resaltar que la cepa VD se ha caracterizado por presentar un crecimiento muy lento en las a_w de 0.98 y 0.995, y además que este crecimiento ha sido nulo en las restantes a_w (0.95, 0.90 y 0.85). No obstante, Samson y col. (2000) reseñan para *Verticillium lecanii* el valor de 0.90 como valor mínimo de a_w de crecimiento.

La ratio de crecimiento es de 2.05 mm/día para una a_w de 0.995 y cuando la temperatura es de 25°C. Conforme descende la a_w también lo hace el crecimiento fúngico, siendo de 0.74 mm/día para la a_w de 0.98.

Cuando la temperatura es de 15°C, hay una caída en el crecimiento fúngico. Los ratios a esta temperatura son de 1.48 mm/día a 0.995 y de 0.46 mm/día para la a_w de 0.98.

Los resultados del análisis de la varianza, del estudio de la influencia de la a_w , la T y su interacción ($a_w \times T$) sobre el crecimiento medio de esta cepa, son los que se reflejan en la Tabla 20. Este análisis muestra el efecto significativo ($P < 0.05$) que tanto los factores simples como su interacción tienen sobre el crecimiento de VD.

Tabla 20: ANOVA del crecimiento de VD; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T) y su interacción ($a_w \times T$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-valor
a_w	4	86.1487	54.89	0.0000 *
T	1	12.2513	7.81	0.0057*
$a_w \times T$	4	1.56941	3.54	0.0083*

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor
* Significativo $P < 0.01$

Para completar el estudio estadístico se representan en la Figura 42 los gráficos de intervalos LSD de comparación de medias para los diferentes niveles de los factores a_w y T.

En el gráfico de intervalos LSD para el factor a_w (Figura 42) se observa que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de crecimiento de los niveles de a_w de 0.995 y 0.98 y entre estos dos niveles y los demás niveles registrados (0.85, 0.90 y 0.95). Ahora bien, tal como podemos ver en el gráfico, entre los crecimientos promedios de los niveles 0.85, 0.90 y 0.95 no existen diferencias, y en realidad esto se produce al no haber mostrado crecimiento la cepa VD a esas a_w .

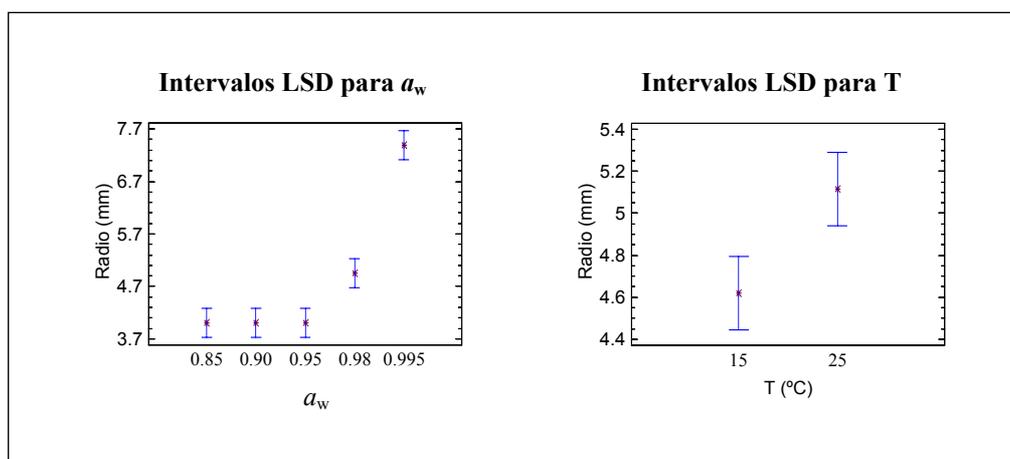


Figura 42: Intervalos LSD de comparación de medias para los factores a_w y T de VD.

Por otra parte, el gráfico de intervalos LDS para el factor T (Figura 42) nos demuestra que hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los crecimientos medios de los dos niveles de T ensayados, dándose los valores más altos cuando la temperatura es de 25°C.

La Figura 43 contiene una serie de fotografías del crecimiento mostrado por la cepa VD a las diferentes a_w y T ensayadas.

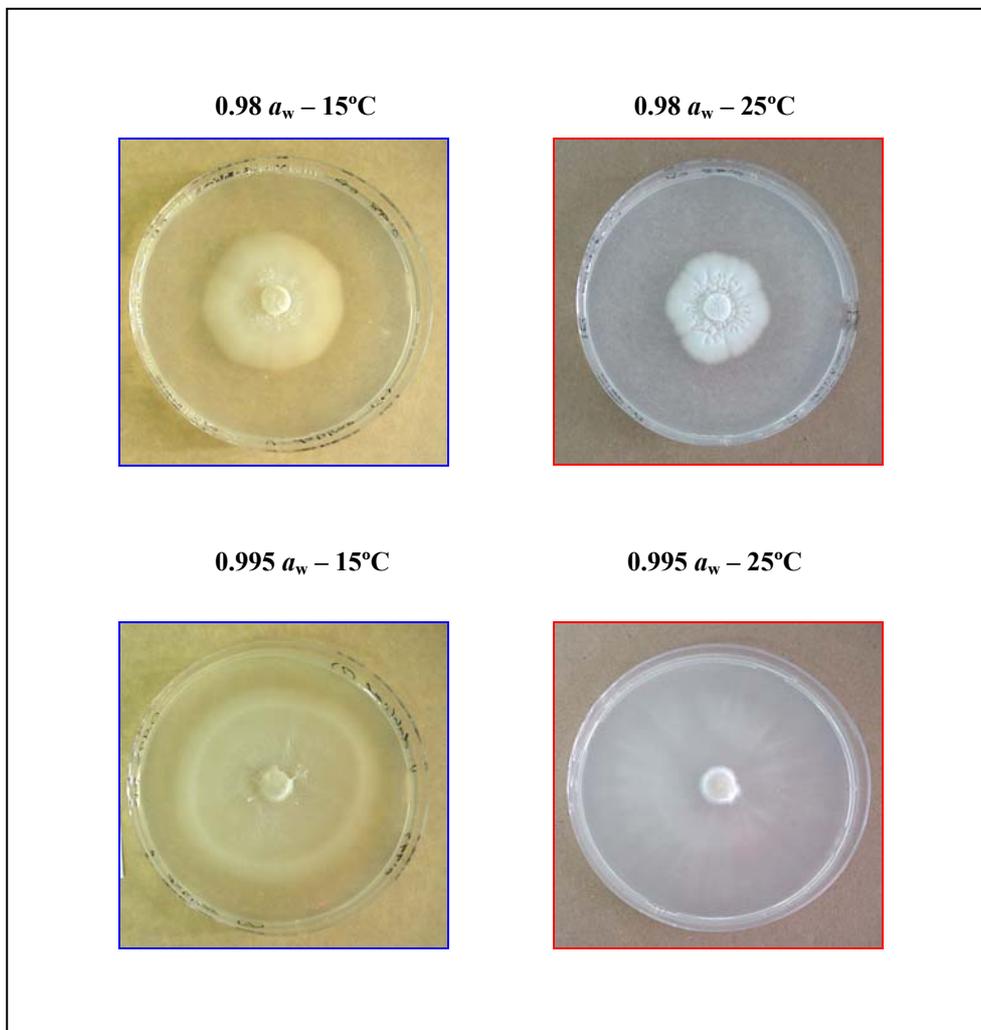


Figura 43: Crecimiento individual de VD a las distintas a_w y T ensayadas.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El apartado de resultados y discusión se ha estructurado en tres bloques, de acuerdo a los tres tipos de experiencias llevadas a cabo en el presente trabajo. Cada uno de ellos es independiente de los demás, pero al mismo tiempo forman un continuo, que nos permitirán entender y evaluar los requerimientos ambientales de los hongos, tan necesarios para comprender su eficacia como agentes de biocontrol.

En el primer bloque se exponen los resultados obtenidos de la influencia de los factores ambientales, actividad de agua y temperatura, en el crecimiento individual de todas las cepas fúngicas objeto de estudio.

En el segundo de ellos, se evalúan esos mismos factores ambientales en el crecimiento dual de las cepas fúngicas.

Y en el último bloque, se analiza el Tipo de Interacción que se origina en las interacciones interespecíficas del bloque anterior, así como el Índice de Dominancia que presenta cada una de las cepas estudiadas, permitiéndonos establecer la capacidad antagonista de *P. oxalicum* y de *T. harzianum* frente a los distintos agentes fitopatógenos ensayados.

5.1.- Efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de las cepas estudiadas individualmente

Existe escasa información sobre los requerimientos ecofisiológicos de la mayoría de los hongos, por lo que el estudio de los factores ambientales, actividad de agua y temperatura, en el crecimiento individual de los hongos, nos permite conocer como se comportará la especie en unas determinadas condiciones. Del mismo modo, el establecer un perfil de crecimiento individual, nos servirá como base para comprobar si en estudios en los que se enfrentan dos especies, éstas mantienen su perfil de crecimiento individual, o si por el contrario, al crecer en común, una especie influye en el desarrollo de la otra.

En el Anexo A se adjuntan de forma gráfica los resultados del estudio individual de cómo afecta la T y la a_w en el crecimiento de las 8 cepas ensayadas: PO, TH, RS, FOL1, FOL2, FOG1, FOG2 y VD. Para cada una de ellas y a las diferentes condiciones de a_w y T analizadas se representa el crecimiento radial (mm) en función del tiempo, con sus correspondientes rectas de regresión (Figuras A-1 a A-8).

5.1.1.- *Penicillium oxalicum* LBVB 1001

Los resultados del estudio individual del crecimiento de la cepa PO son los que se muestran en la Tabla 7. Dichos valores se han obtenido a partir del ajuste de las rectas de regresión de los gráficos de la Figura A-1 del Anexo A.

Tabla 7: Ratio de crecimiento (mm/día) de PO a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w).

PO	a_w				
	0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	0.86	1.88	3.22	4.43	3.14
15°C	0.20	1.01	2.38	2.71	1.87

En la Figura 22 podemos observar esos valores de forma gráfica, donde se representa la velocidad de crecimiento (mm/día) en función de la T para las distintas a_w .

La cepa PO muestra crecimiento en todas las condiciones de a_w y T analizadas y presenta el patrón de crecimiento reflejado en la Figura 22, donde se observa que la pauta seguida a ambas temperaturas es la misma.

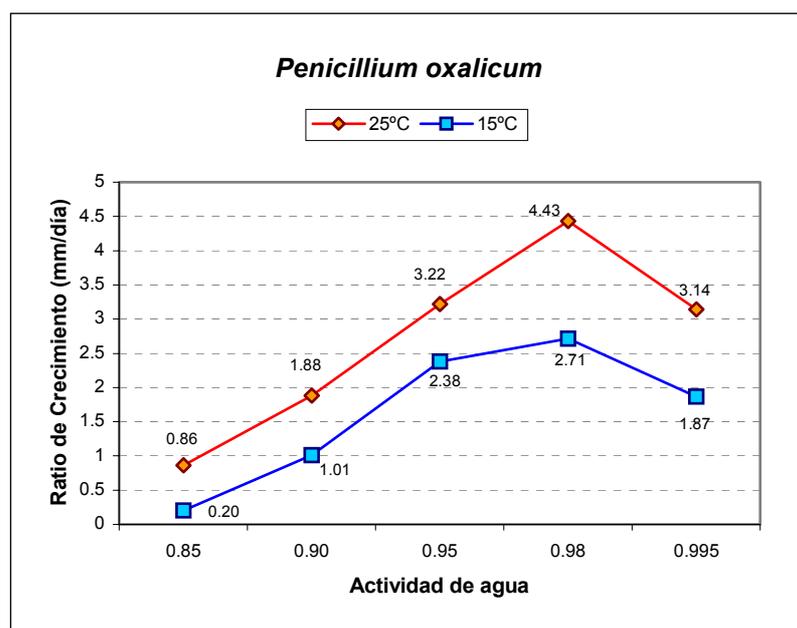


Figura 22: Velocidad de crecimiento (mm/día) de PO a las distintas a_w en función de la T.

Cuando la cepa se hace crecer a la temperatura de 25°C, el máximo crecimiento se obtiene para una a_w de 0.98 con ratios de 4.43 mm/día. Companys (1996), Lacey y Magan (1991) y Marín y col. (1988 a) también sitúan el crecimiento máximo para algunas especies de *Penicillium* a la a_w de 0.98. Las velocidades de crecimiento radial máximo varían ampliamente con la a_w , pero el óptimo para la mayoría de las especies de *Penicillium* se encuentra entre 0.97-0.98 de a_w (Hocking y Pitt, 1979). Pascual y col. (1997) realizaron estudios de cómo afecta la temperatura al crecimiento de PO y observaron que el crecimiento óptimo se producía a 25°C.

A las a_w de 0.95 y 0.90 y a 25°C las ratios de crecimiento bajan a 3.22 y 1.88 mm/día respectivamente, y es menor que la unidad a la a_w de 0.85. Por ello podemos considerar 0.85 como valor de a_w más bajo, de todos los ensayados, donde hemos obtenido crecimiento. En distintas especies de *Penicillium* se observaron comportamientos similares (Ayerst, 1969; Companys, 1996; Lacey y Magan, 1991). Sin embargo, Samson y col. (2000) citan como a_w mínima para PO el valor de 0.88.

Al analizar los resultados de la cepa PO a 15°C, se observa que el crecimiento de las colonias siempre es menor que a 25°C para todas las condiciones de a_w . También a esta temperatura, es para la a_w de 0.98 donde se obtiene la máxima velocidad de crecimiento (2.71 mm/día). A partir de la a_w de 0.90 el crecimiento disminuye (1.01 mm/día), y es prácticamente nulo a 0.85 de a_w (0.20 mm/día). En las especies de *Penicillium* estudiadas por Companys (1996) y Marín y col. (1988 a) el máximo crecimiento también fue a 0.98 de a_w , pero no mostraron crecimiento a la a_w de 0.85; mientras que la cepa de PO objeto de estudio sí crece a 0.85 de a_w , aunque el valor que alcanza es muy bajo, pero algo superior al obtenido por Companys (1996) para las especies de *Penicillium* a 25°C.

Si comparamos la evolución de la velocidad de crecimiento a ambas temperaturas se observan varias similitudes: que la cepa crece a todas las a_w ensayadas, que el crecimiento máximo se obtiene para una a_w de 0.98, y además que los valores que se alcanzan a la a_w de 0.95 son superiores a los de 0.995 de a_w . Esta última observación también ha sido reseñada por Sáenz (1996).

El análisis estadístico de la varianza (Tabla 8) para estudiar los efectos de la a_w , la T y su interacción doble ($a_w \times T$) sobre el crecimiento medio de PO, nos demuestra que los factores simples son significativos ($P < 0.05$) en el crecimiento de la cepa, mientras que su interacción pese a no tener un efecto significativo, su P-valor nos indica que está próximo a serlo.

Tabla 8: ANOVA del crecimiento de PO; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T) y su interacción ($a_w \times T$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-valor
a_w	4	1230.18	30.91	0.0000*
T	1	1474.76	37.05	0.0000*
$a_w \times T$	4	80.7184	2.03	0.0933

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor
* Significativo $P < 0.05$

Para completar el estudio estadístico se realizaron los gráficos de intervalos LSD de comparación de medias para los diferentes niveles de los factores a_w y T (Figura 23).

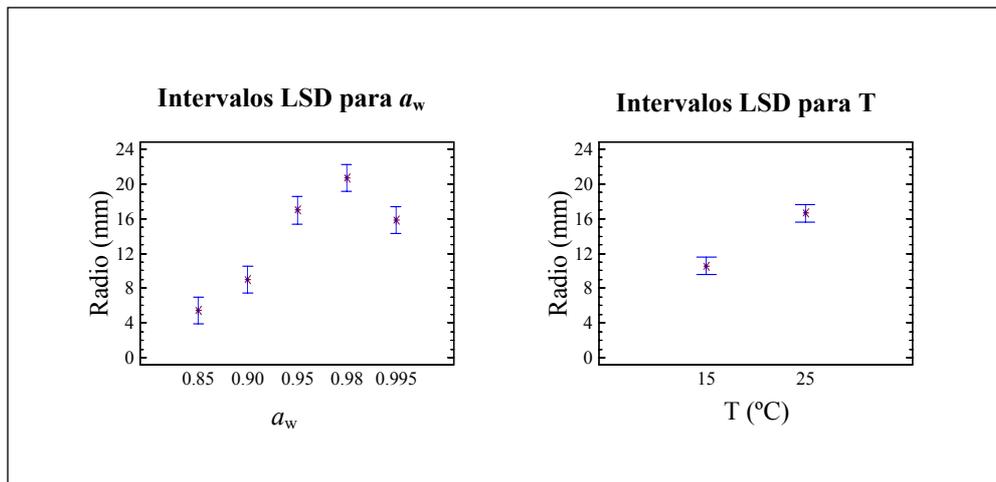


Figura 23: Intervalos LSD de comparación de medias para los factores a_w y T de PO.

El gráfico de intervalos LSD para el factor a_w (Figura 23) nos muestra la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los crecimientos medios a los distintos niveles de a_w , excepto entre los niveles 0.95 y 0.995. Este gráfico nos releva que es el nivel de 0.98 de a_w donde la cepa obtiene los valores máximos de crecimiento.

La representación gráfica de los intervalos LSD para el factor T (Figura 23) nos manifiesta la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los crecimientos promedios de los dos niveles de T analizados, siendo mayores cuando la temperatura es a 25°C.

La Figura 24 contiene una serie de fotografías del crecimiento mostrado por la cepa PO a las diferentes a_w y T ensayadas.

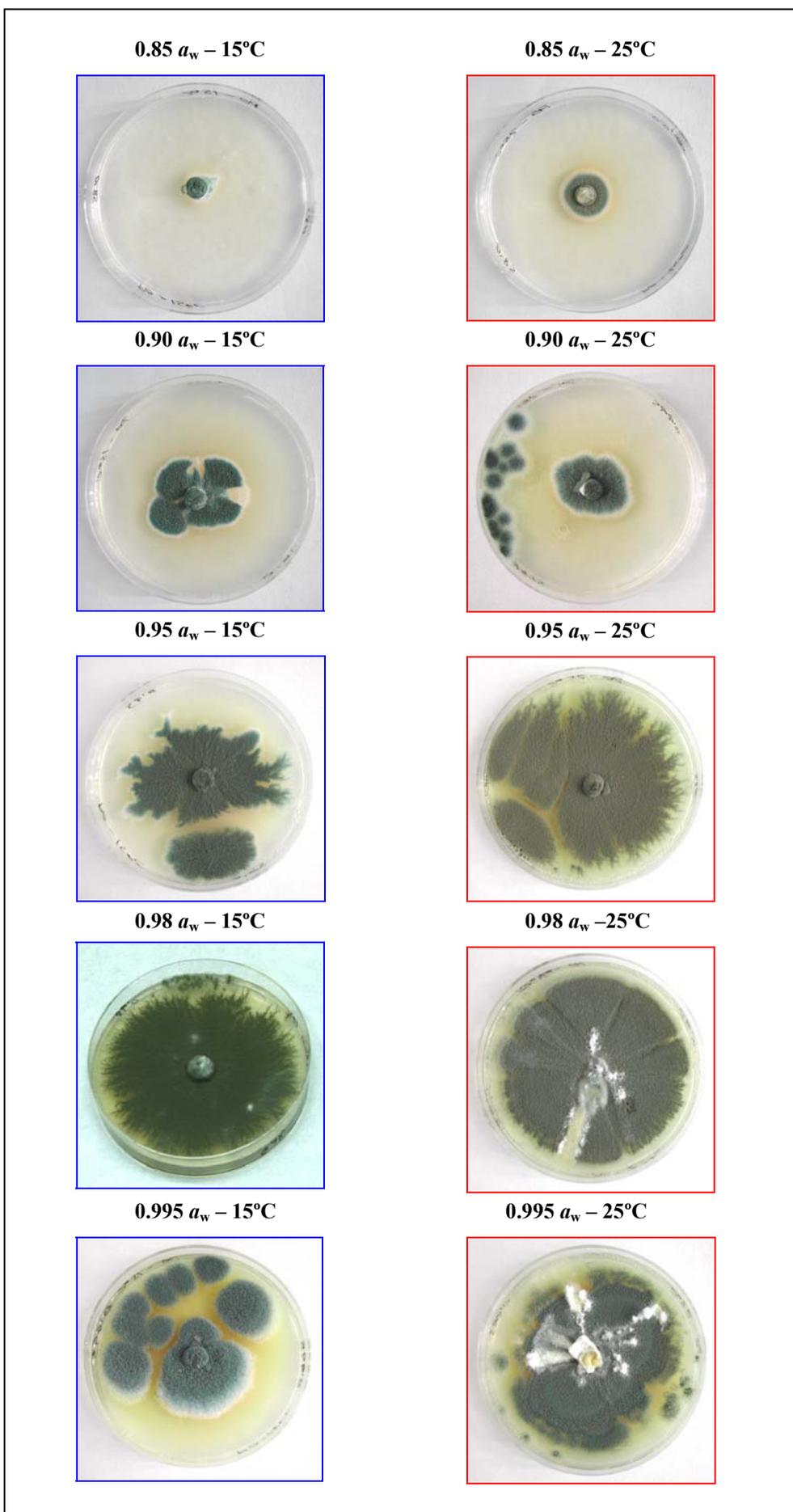


Figura 24: Crecimiento individual de PO a las distintas a_w y T ensayadas.

5.1.2.- *Trichoderma harzianum* LBVB 1010

Los resultados obtenidos del crecimiento individual de TH para las distintas a_w y T ensayadas son los que se reflejan en la Tabla 9. Los valores que en ella aparecen se han obtenido a partir del ajuste de las rectas de regresión de la Figuras A-2 del Anexo A.

Tabla 9: Ratio de crecimiento (mm/día) de TH a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w).

TH	a_w				
	0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	0.00	0.00	4.91	12.33	16.31
15°C	0.00	0.00	1.00	6.80	11.06

En la representación gráfica de esos valores (Figura 25) se puede observar que TH es un hongo que se desarrolla mejor en los niveles más altos de a_w , a las a_w de 0.995 y 0.98, por ello podría ser considerado un hongo con tendencia higrofilica (Pelhate, 1968). En las a_w más bajas, de 0.85 a 0.90, el crecimiento de la cepa ha resultado ser nulo.

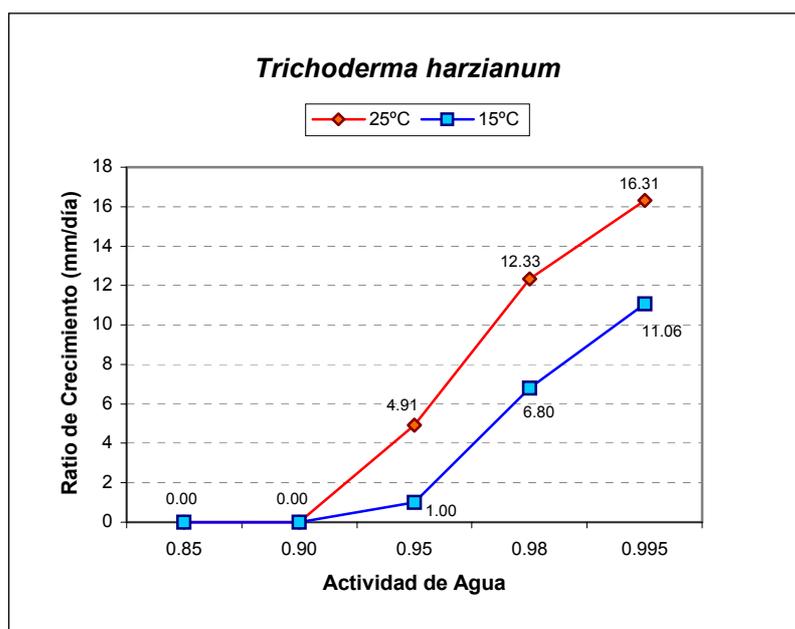


Figura 25: Velocidad de crecimiento (mm/día) de TH a las distintas a_w en función de la T.

La cepa TH tanto en las experiencias a 15°C como a 25°C se desarrolla en las mismas a_w , siendo éstas las comprendidas entre 0.95 y 0.995 de a_w . Companys (1996) y Marín y col. (1988 a), también observaron que el comportamiento de *Trichoderma viride* era el mismo que el obtenido en este trabajo para TH.

Para la temperatura de 25°C, el óptimo de crecimiento es a la a_w de 0.995, con ratios que llegan a alcanzar los 16.31 mm/día. A medida que disminuye la a_w también lo hace la ratio de crecimiento, obteniéndose valores de 12.33 mm/día para la a_w de 0.98. A partir de esta a_w se observa que hay un descenso brusco en el crecimiento, con valores de 4.91 mm/día para 0.95 de a_w . Marín y col. (1988 a) establecen que *T. viride* no es capaz de crecer a las a_w de 0.85 y 0.90 en presencia de especies de *Fusarium*. En este estudio hemos comprobado que TH tampoco crece a esas a_w cuando se hace crecer de forma individual.

Cuando la temperatura es de 15°C, las colonias crecen menos que a 25°C, para todas las condiciones de a_w en las que hay crecimiento del hongo. A esta temperatura, la a_w óptima también es a 0.995, con valores de 11.06 mm/día, decreciendo hasta 1.00 mm/día a 0.95 de a_w .

Al comparar el comportamiento de la cepa TH a las dos temperaturas estudiadas, además de crecer en las mismas a_w , podemos observar una variación de las tasas de crecimiento con la temperatura, siendo la disminución de la temperatura la que ocasiona el descenso del crecimiento fúngico. Montealegre y Henríquez (1990) también observaron la existencia de estas variaciones en las ratios de crecimiento con la temperatura.

La Tabla 10 nos muestra los resultados del estudio del análisis de la varianza de los efectos de la a_w , la T y su interacción ($a_w \times T$) sobre el crecimiento medio de TH.

Tabla 10: ANOVA del crecimiento de TH; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T) y su interacción ($a_w \times T$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-valor
a_w	4	6283.28	60.70	0.0000 *
T	1	1986.36	19.19	0.0000 *
$a_w \times T$	4	369.382	3.57	0.0079 *

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor

* Significativo $P < 0.05$

A la vista de los resultados podemos concluir que tanto los factores simples a_w y T, como su interacción, tienen influencia significativa ($P < 0.05$) sobre el crecimiento medio de la cepa TH.

En la Figura 26 se representan los gráficos de los intervalos LSD de comparación de medias para los distintos niveles de los factores a_w y T.

En el gráfico de intervalos LSD para el factor a_w , se aprecia que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de crecimiento de los diferentes niveles, salvo entre los dos primeros (0.85 y 0.90) en los que no hay diferencias. Esto era de esperar puesto que para esas a_w la cepa TH no presentó crecimiento.

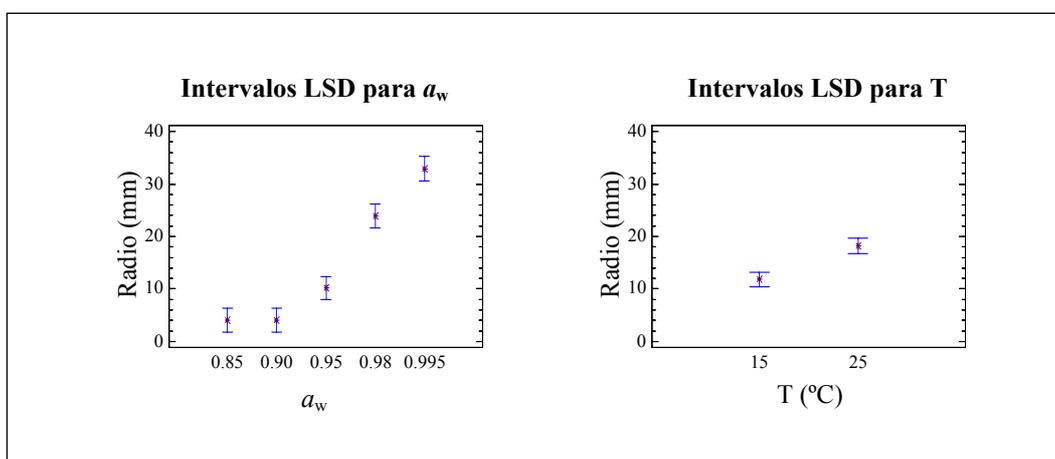


Figura 26: Intervalos LSD de comparación de medias para los factores a_w y T de TH.

Respecto al gráfico de intervalos LSD para el factor T (Figura 26), establecemos que hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los crecimientos promedios de los dos niveles de T, existiendo una clara diferencia entre ambos y lográndose los mayores valores a la temperatura de 25°C.

La Figura 27 contiene una serie de imágenes del crecimiento mostrado por la cepa TH a las diferentes a_w y T ensayadas.

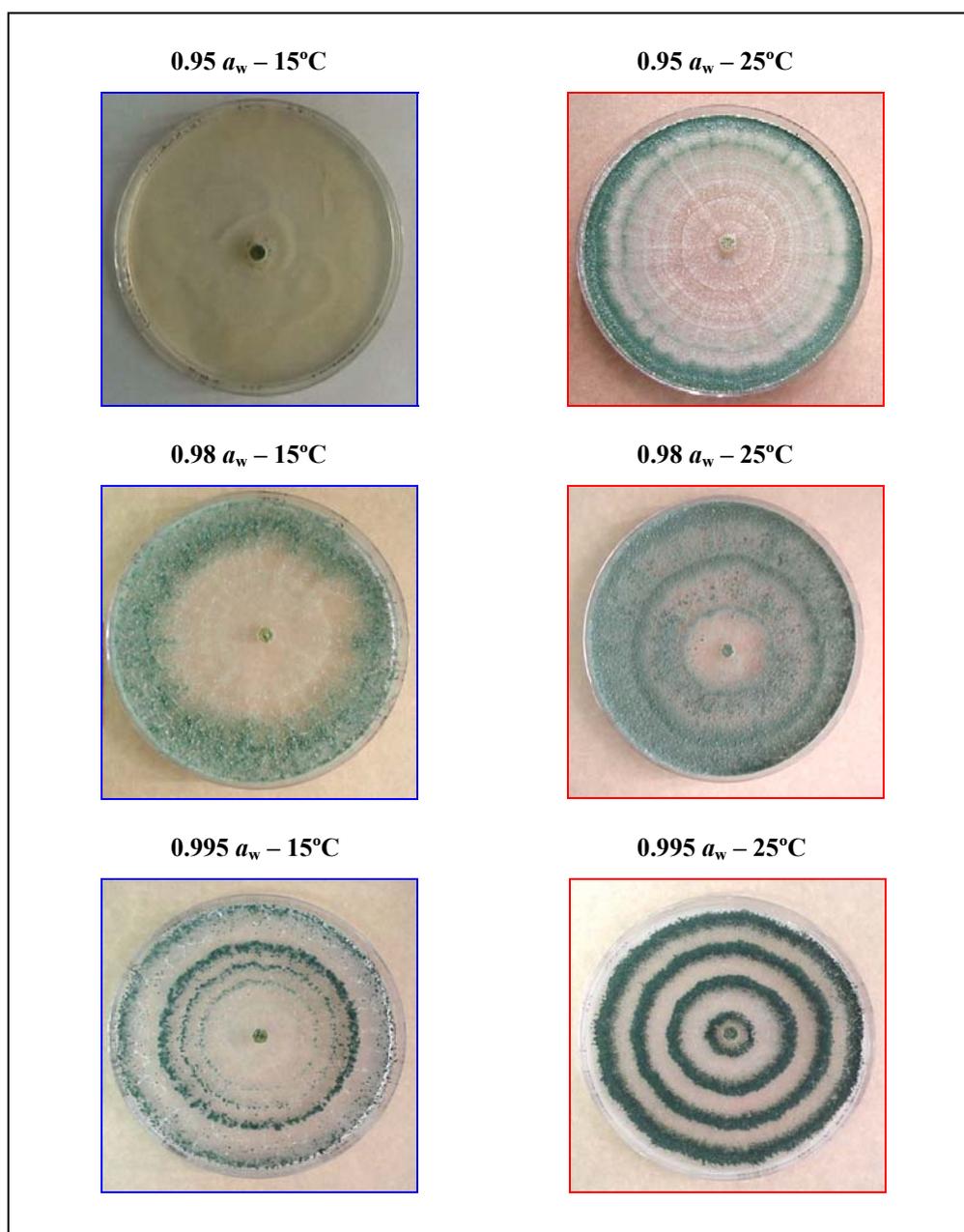


Figura 27: Crecimiento individual de TH a las distintas a_w y T ensayadas.

5.1.3.- *Rhizoctonia solani* LBVB 2819

Los resultados del crecimiento individual de la cepa RS para las distintas condiciones de a_w y T ensayadas se muestran en la Tabla 11. Los valores se han obtenido a partir del ajuste de las rectas de regresión mostradas en los gráficos de la Figura A-3 del Anexo A.

Tabla 11: Ratios de crecimiento (mm/día) de RS a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w).

RS	a_w				
	0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	0.00	0.00	0.00	5.09	7.76
15°C	0.00	0.00	0.00	1.34	4.61

En la Figura 28 se pueden observar esos valores de forma gráfica, donde se representa la velocidad de crecimiento (mm/día) en función de la temperatura para las distintas a_w .

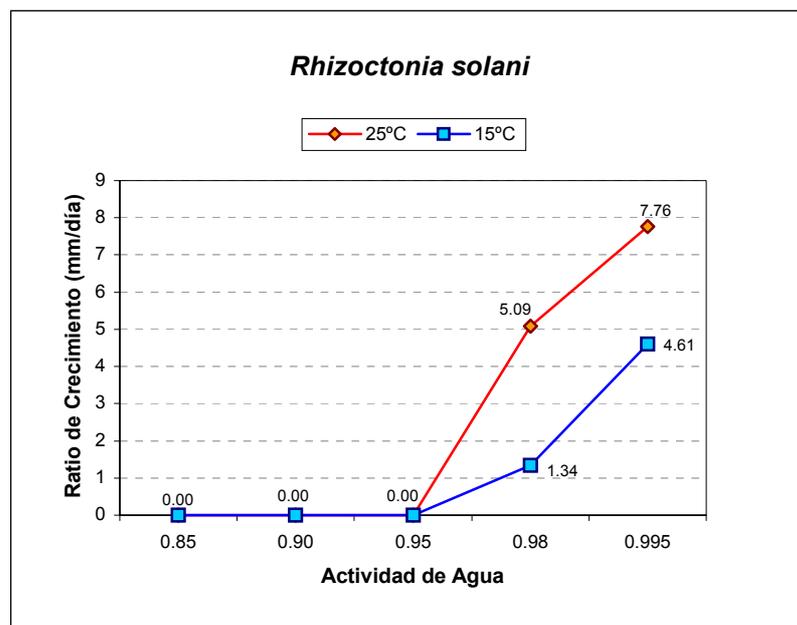


Figura 28: Velocidad de crecimiento (mm/día) de RS a las distintas a_w en función de la T.

El perfil de crecimiento mostrado por la cepa RS es el mismo a las dos temperaturas ensayadas, y presenta crecimiento cuando la disponibilidad de agua es elevada, es decir a las a_w de 0.995 y 0.98. Para las a_w comprendidas entre 0.85 y 0.95 esta cepa no muestra crecimiento. Por ello, suponemos que nos encontramos ante un hongo higrofilico, ya que para crecer necesita niveles de agua que están comprendidos entre 0.95-1.00 (Pelhate 1968).

Las ratios de crecimiento que obtiene la cepa RS en la experiencia realizada a la temperatura de 25°C son de 7.76 mm/día a 0.995 y de 5.09 mm/día a 0.98, mientras que en la realizada a 15°C dichos valores descienden hasta 4.61 mm/día y 1.34 mm/día para las a_w de 0.995 y de 0.98, respectivamente.

Se observa que hay un descenso del crecimiento fúngico a medida que disminuye la temperatura, de 25°C a 15°C, ocasionando una caída en los valores de las ratios de crecimiento.

Esta cepa no se desarrolla en las condiciones de 0.85, 0.90 y 0.95 de a_w , como se indicó anteriormente, pero se observa que la pendiente de la ratio de crecimiento de RS a 25°C (Figura 28) es bastante pronunciada a medida que aumenta la a_w desde el valor de 0.95; por lo que creemos que es a partir de ese valor cuando se inicia el crecimiento de la cepa. Samson y col. (2000) indican que la a_w mínima de crecimiento para RS se sitúa en el valor de 0.96.

Se realizó el estudio estadístico de la varianza para comprobar si existían diferencias significativas en el crecimiento promedio de RS para las distintas condiciones de a_w y T, así como de su interacción (a_w x T). Los resultados de este análisis (Tabla 12) ponen de manifiesto que tanto los factores simples como su interacción tienen influencia significativa ($P < 0.05$) sobre el crecimiento de RS.

Tabla 12: ANOVA del crecimiento de RS; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T) y su interacción ($a_w \times T$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-valor
a_w	4	2187.80	93.64	0.0000 *
T	1	741.125	31.72	0.0000*
$a_w \times T$	4	286.70	12.27	0.0000*

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor
* Significativo $P < 0.05$

Además, se representan los gráficos de intervalos LSD de comparación de medias para los diferentes niveles de los factores a_w y T (Figura 29).

Los intervalos LSD para el factor a_w (Figura 29), muestran gráficamente que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los crecimientos medios de los distintos niveles de a_w , excepto entre los niveles de 0.85, 0.90 y 0.95; lo que era de esperar, ya que a estas a_w la cepa no mostró crecimiento.

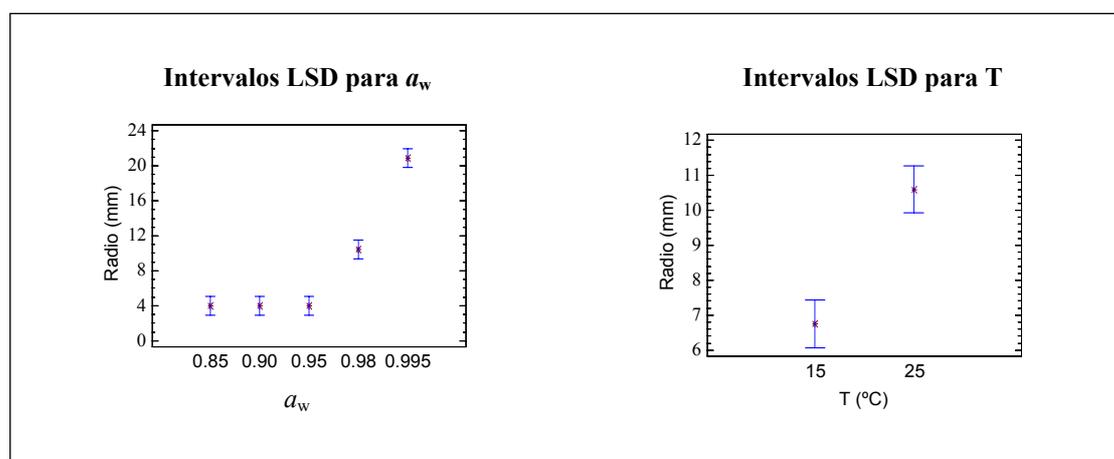


Figura 29: Intervalos LSD de comparación de medias para los factores a_w y T de RS.

El gráfico de intervalos LSD para el factor T (Figura 29), nos confirma que realmente existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los crecimientos promedio a los dos niveles de T, siendo este crecimiento medio mayor a la temperatura de 25°C.

La Figura 30 contiene una serie de fotografías del crecimiento mostrado por la cepa RS a las diferentes a_w y T ensayadas.

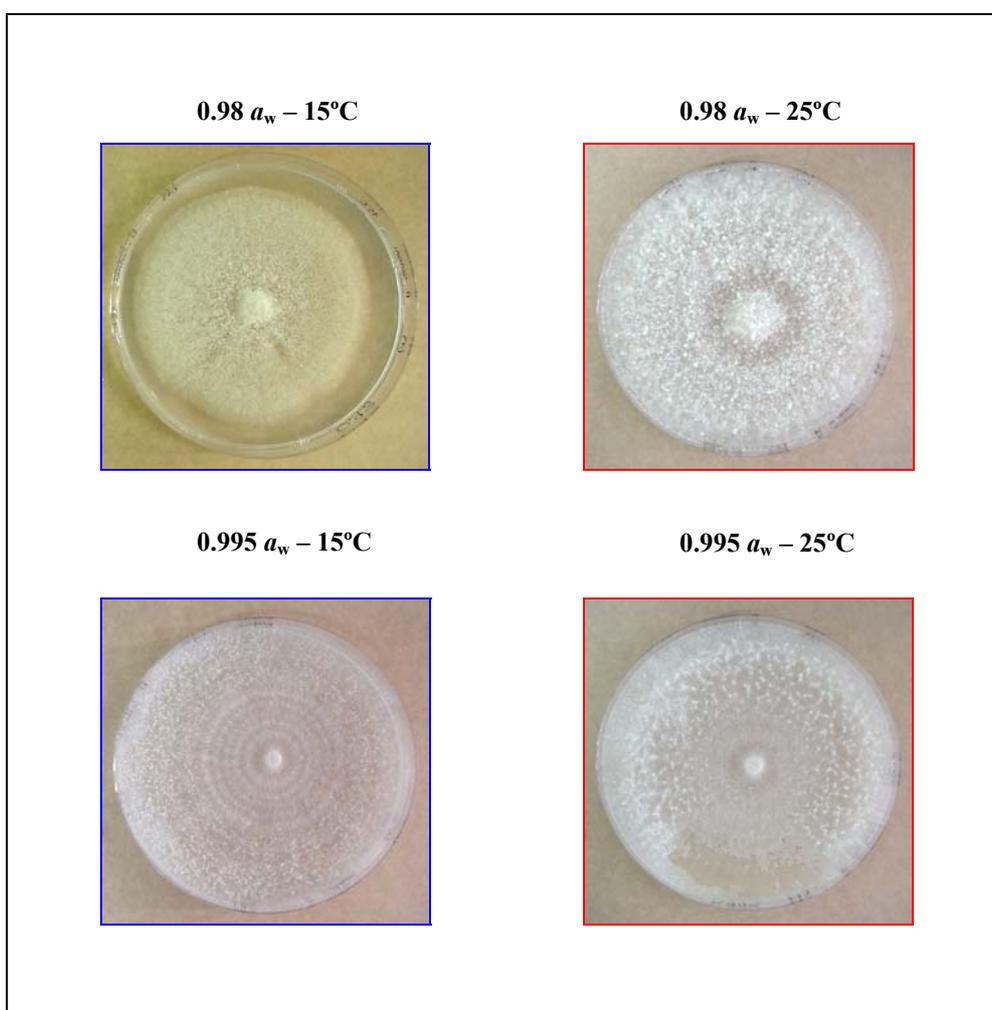


Figura 30: Crecimiento individual de RS a las distintas a_w y T ensayadas.

5.1.4.- *Fusarium oxysporum*

Se realizó el estudio ecofisiológico de las formas especiales (f.sp.) de *Fusarium oxysporum*: FOL1, FOL2, FOG1 y FOG2 individualmente, aunque los resultados se presentan conjuntamente atendiendo a la f.sp. a la que pertenecen, es decir, por una parte las cepas FOL1 y FOL2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, y por otra las cepas FOG1 y FOG2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. El análisis estadístico de la varianza se hizo para cada cepa, independientemente de la f.sp., para ver como afectan los factores estudiados a su crecimiento.

5.1.4.1.- *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715 y 2866

Los resultados del crecimiento individual de las cepas FOL1 (2715) y FOL2 (2866) son los que se muestran en la Tabla 13; obtenidos a partir del ajuste de las rectas de regresión de las Figuras A-4 y A-5 del Anexo A.

Tabla 13: Ratios de crecimiento (mm/día) de las cepas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w). FOL1: cepa 2715; FOL2: cepa 2866.

<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	a_w									
	0.85		0.90		0.95		0.98		0.995	
	FOL1	FOL2	FOL1	FOL2	FOL1	FOL2	FOL1	FOL2	FOL1	FOL2
25°C	0.00	0.00	0.09	0.45	3.05	2.97	5.01	4.98	6.28	5.75
15°C	0.00	0.00	0.00	0.00	1.72	1.89	4.23	3.36	4.63	4.09

A partir de los datos de la Tabla 13, se representa en la Figura 31 la velocidad de crecimiento (mm/día) para cada cepa fúngica a las distintas a_w y T ensayadas.

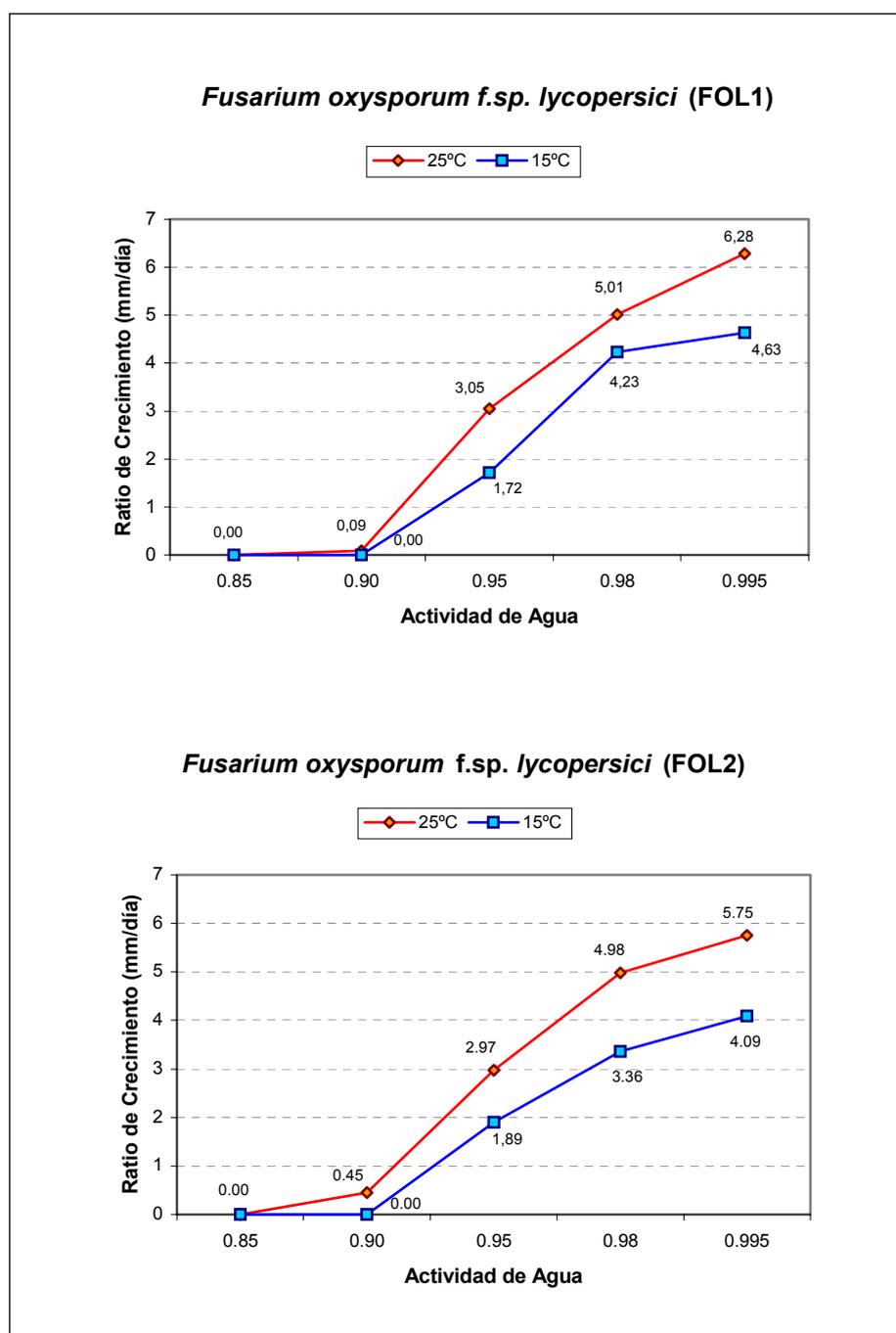


Figura 31: Velocidad de crecimiento (mm/día) de FOL1 y FOL2 a las distintas a_w en función de la T.

A la temperatura de 25°C, ambas cepas responden, a las a_w ensayadas, de forma similar. El intervalo de crecimiento para FOL1 y FOL2 está comprendido entre 0.90 y 0.995 de a_w . Por debajo de 0.95, al disminuir la a_w , el crecimiento sufre un descenso, y

llega a ser nulo a 0.85. Este comportamiento también ha sido observado por Companys (1996), Frisvad y Samson (1991), Lacey y Magan (1991), Marín (1995) y Marín y col. (1998 a) para diferentes especies de *Fusarium*. En general la cepa FOL1 presenta ratios de crecimiento ligeramente mayores que FOL2, menos para la a_w de 0.90 donde FOL2 supera a FOL1 en crecimiento.

De los resultados obtenidos a 15°C, se deduce que las dos cepas también presentan una pauta de crecimiento semejante. A esta temperatura el intervalo de crecimiento se establece entre 0.95 y 0.995. Companys (1996) y Marín y col. (1988 a) observaron que algunas especies de *Fusarium* presentaban un crecimiento muy bajo a la a_w de 0.90, mientras que las cepas FOL1 y FOL2 estudiadas en este trabajo no crecen a esa a_w . En las a_w más altas (0.98 y 0.995) la cepa FOL1 crece algo más que FOL2, y el crecimiento es más o menos similar a 0.95.

En general se aprecia que hay un descenso en el crecimiento fúngico al disminuir la a_w , tanto a 15°C como a 25°C, y además que los valores obtenidos a 15°C son inferiores que a 25°C.

Los resultados del análisis de la varianza para el estudio de la influencia de los factores a_w , T y su interacción ($a_w \times T$) sobre el crecimiento medio de FOL1 y FOL2, son los que se muestran en las Tablas 14 y 15 respectivamente.

Para la cepa FOL1 (Tabla 14), este análisis demuestra el efecto significativo ($P < 0.05$) que los factores simples tienen sobre el crecimiento promedio de la cepa, mientras que la interacción de esos factores a pesar de no tener un efecto significativo, su P-valor nos muestra que está próximo a serlo.

Tabla 14: ANOVA del crecimiento de FOL1; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T) y su interacción ($a_w \times T$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-valor
a_w	4	2573.47	49.79	0.0000*
T	1	543.75	10.52	0.0015*
$a_w \times T$	4	112.123	2.17	0.0753

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor

* Significativo $P < 0.05$

Respecto a la cepa FOL2 (Tabla 15), el análisis estadístico nos indica que los factores simples tienen efecto significativo ($P < 0.05$) sobre el crecimiento medio de la cepa, no así la interacción formada por los mismos.

Tabla 15: ANOVA del crecimiento de FOL2; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T) y su interacción ($a_w \times T$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-valor
a_w	4	2318.0	52.64	0.0000*
T	1	590.663	13.41	0.0003*
$a_w \times T$	4	83.5843	1.90	0.1138

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor

* Significativo $P < 0.05$

Los gráficos de los intervalos LSD para la a_w de FOL1 y de FOL2 (Figura 32) nos indican que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de crecimiento de los niveles siguientes: el crecimiento promedio a 0.95 es significativamente distinto a los registrados a los demás niveles de a_w . Tal como podemos ver en los gráficos, no existen diferencias significativas entre las medias a 0.85 y 0.90, ni entre 0.98 y 0.995, aunque entre estos dos grupos lógicamente sí que hay

diferencias. En realidad ocurre que a la a_w de 0.85 no hay crecimiento de las cepas y a 0.90 éste es muy bajo.

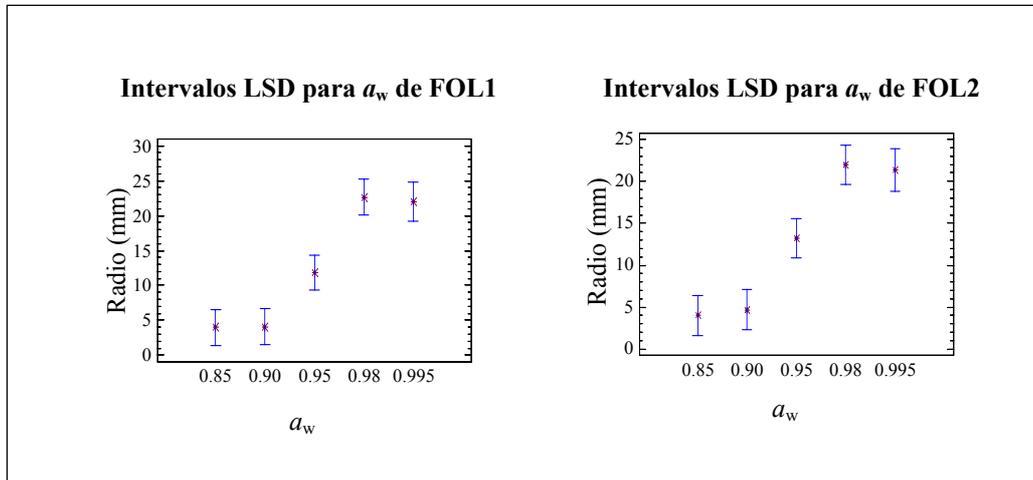


Figura 32: Intervalos LSD de comparación de medias para el factor a_w de FOL1 y FOL2.

En la Figura 33 se representan los gráficos de intervalos LSD de comparación de medias para los diferentes niveles de T de FOL1 y de FOL2. Estos gráficos establecen que existen claras diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los promedios correspondientes a los dos niveles de T ensayados, obteniéndose en las dos cepas un crecimiento medio mayor a la temperatura de 25°C.

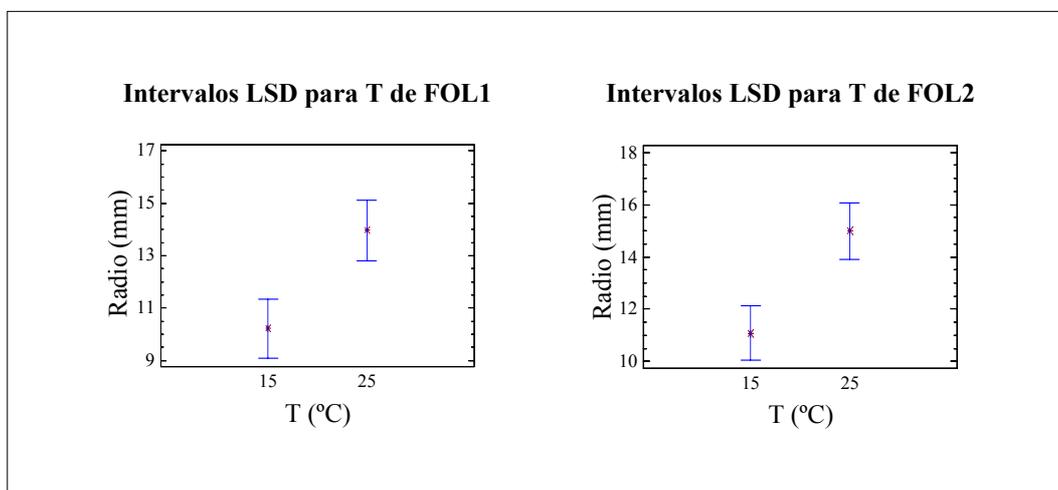


Figura 33: Intervalos LSD de comparación de medias para el factor T de FOL1 y FOL2.

Las Figuras 34 y 35 contienen una serie de imágenes del crecimiento mostrado por las cepas FOL1 y FOL2 a las diferentes a_w y T ensayadas.

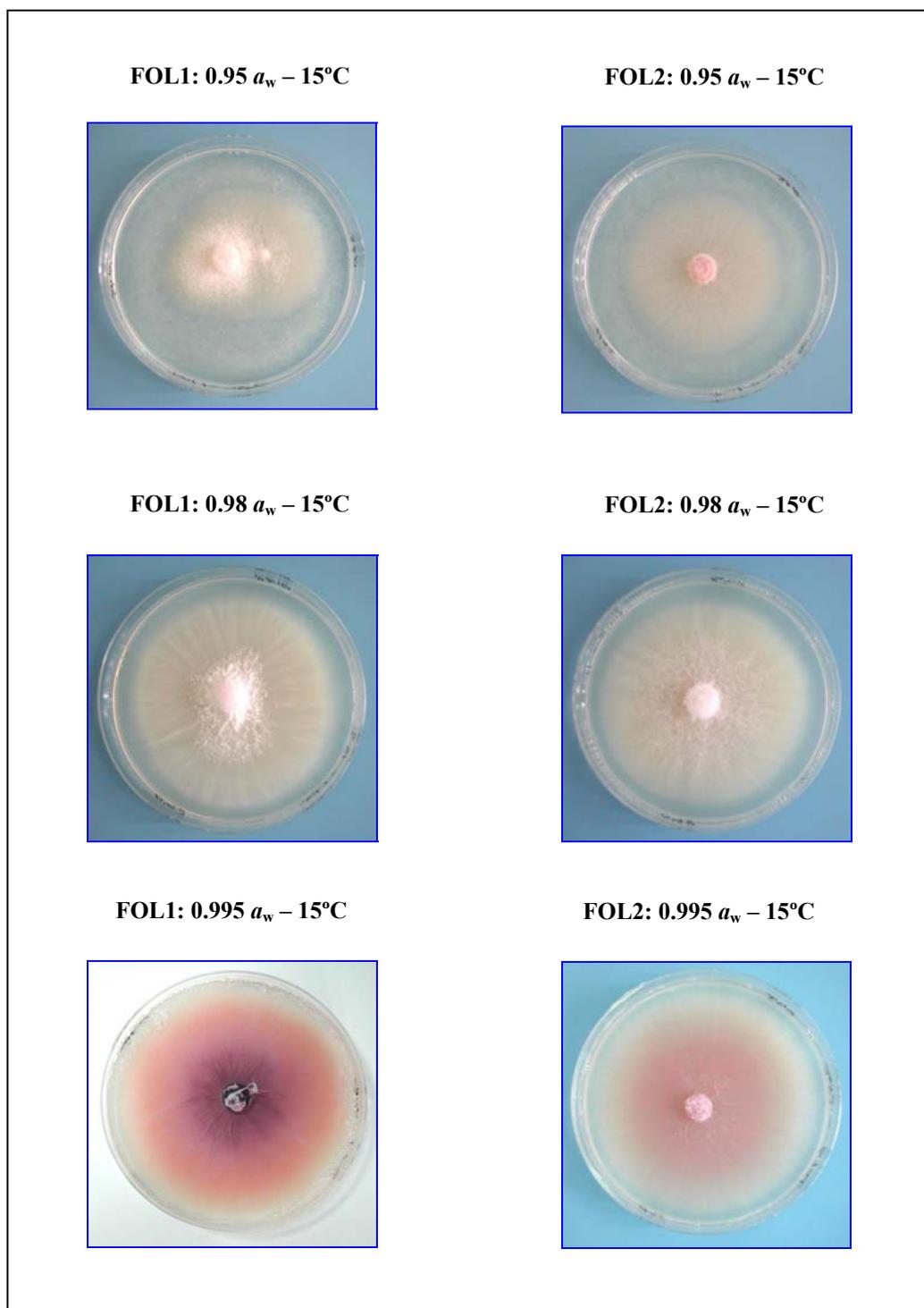


Figura 34: Crecimiento individual de FOL1 (izda.) y FOL2 (dcha.) a las distintas a_w y 15°C.

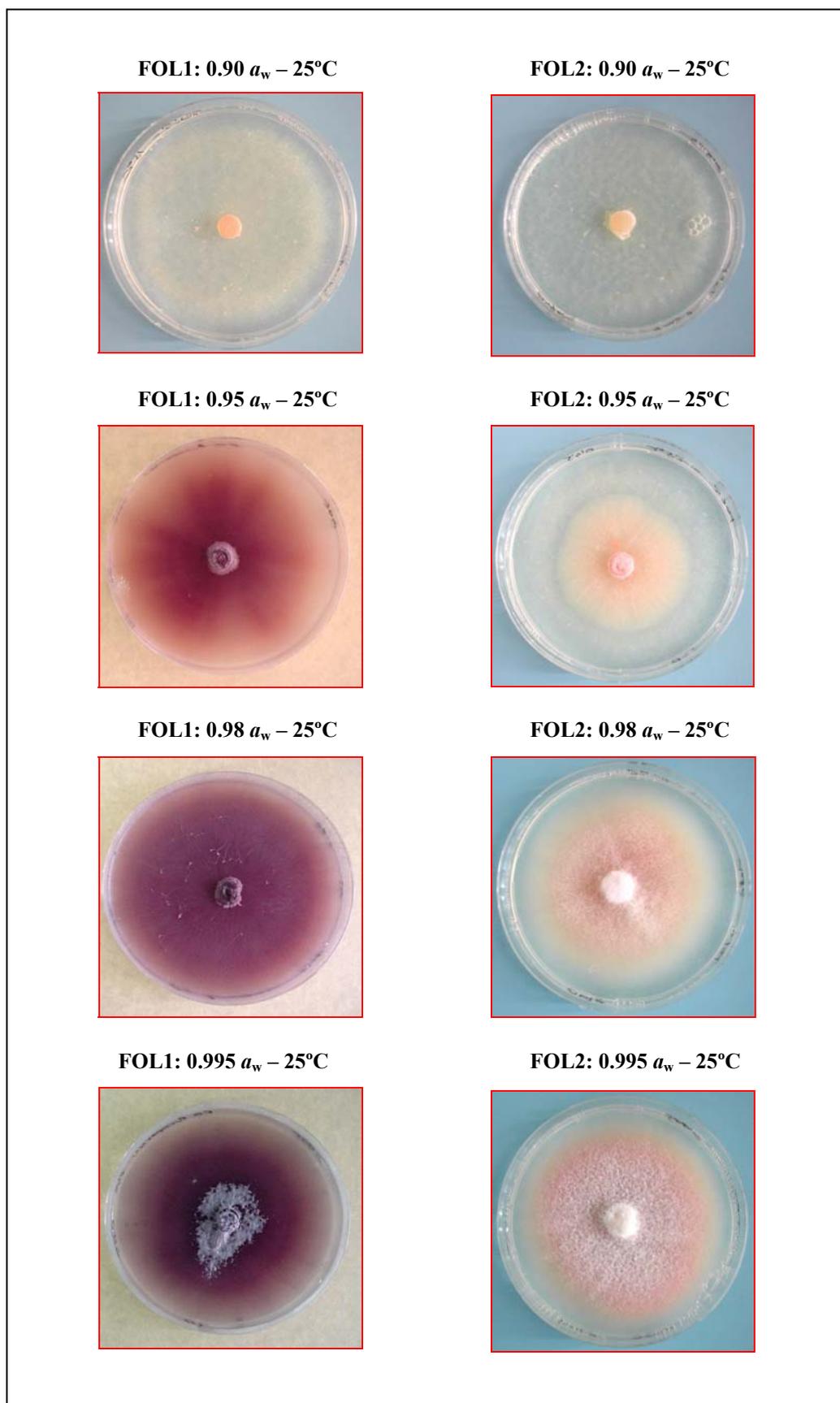


Figura 35: Crecimiento individual de FOL1 (izda.) y FOL2 (dcha.) a las distintas a_w y 25°C.

5.1.4.2.- *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* CECT 2867 y 2868

El perfil de crecimiento de las cepas FOG1 (2867) y FOG2 (2868) es semejante al de las dos anteriores (FOL1 y FOL2). En la Tabla 16 se muestran los valores obtenidos de las ratios de crecimiento (mm/día) para cada una de ellas, y en la Figura 36 se representan gráficamente dichos valores. Los datos utilizados para su representación se han obtenido a partir del ajuste de las rectas de regresión de las Figuras A-6 y A-7 del Anexo A.

Tabla 16: Ratios de crecimiento (mm/día) de las cepas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w). FOG1: cepa 2867; FOG2: cepa 2868.

<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i>	a_w									
	0.85		0.90		0.95		0.98		0.995	
	FOG1	FOG2	FOG1	FOG2	FOG1	FOG2	FOG1	FOG2	FOG1	FOG2
25°C	0.00	0.00	0.38	0.19	2.24	2.68	4.66	5.51	5.50	6.89
15°C	0.00	0.00	0.00	0.00	1.63	1.98	3.07	4.40	4.08	4.94

En las dos cepas, los valores máximos de crecimiento a 25°C (Figura 36), se dan a la a_w de 0.995, y a partir de aquí descienden a medida que disminuye la a_w , siendo el crecimiento muy bajo a la a_w de 0.90, y nulo a 0.85. Estos resultados coinciden con los reseñados por Companys (1996), Frisvad y Samson (1991), Lacey y Magan (1991), Marín (1995) y Marín y col. (1998 a) para otras especies de *Fusarium*. Aunque el patrón de crecimiento de la forma especial FOG1 es similar a la de FOG2, ésta última obtiene valores algo mayores que FOG1 a las tres a_w más altas, y llega a superarle, incluso en más de 1 mm/día a 0.995 de a_w .

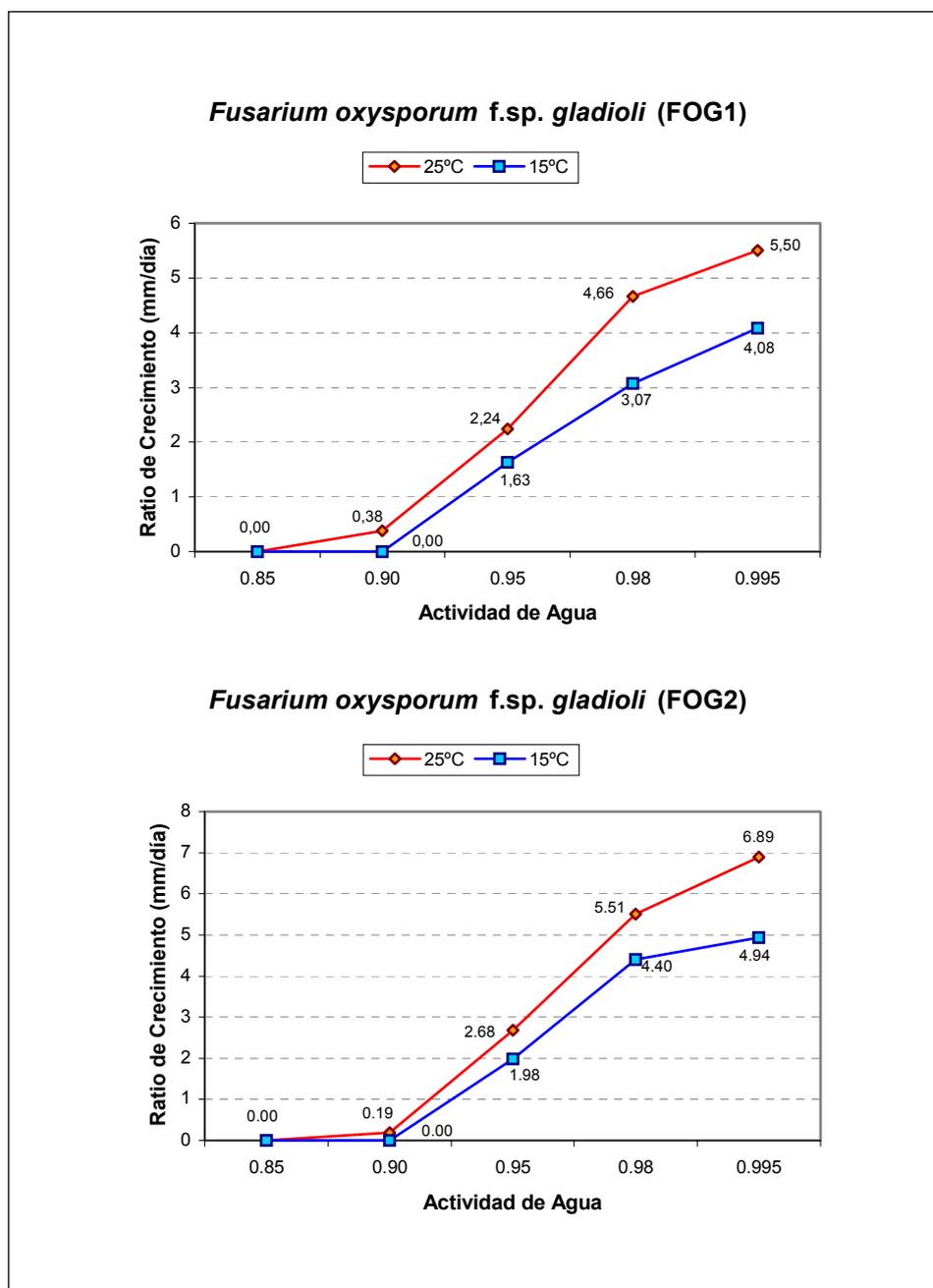


Figura 36: Velocidad de crecimiento (mm/día) de FOG1 y FOG2 a las distintas a_w en función de la T.

A la temperatura de 15°C y a las a_w ensayadas (Figura 36), el intervalo de crecimiento se establece entre 0.95 y 0.995 de a_w ; evolución similar a la observada para las cepas FOL1 y FOL2. Al igual que en ellas, las ratios descienden al ser menor la

disponibilidad de agua, y además, en todas las a_w analizadas se observa que la cepa FOG2 supera a FOG1 en los valores de crecimiento obtenidos.

Nuevamente en esta experiencia las ratios de crecimiento son mayores a 25°C que a 15°C, coincidiendo con Lacey y Magan (1991) que señalan que la T óptima para el género *Fusarium* es de 25°C.

En las Tablas 17 y 18 se muestran los resultados del análisis de la varianza para FOG1 y FOG2 del efecto que tienen la a_w , la T y su interacción ($a_w \times T$) en el crecimiento medio de cada una de las cepas.

En la cepa FOG1 (Tabla 17) este análisis demuestra los efectos significativos ($P < 0.05$) tanto de los factores simples como de su interacción sobre el crecimiento medio de esta cepa. Sin embargo, en la cepa FOG2 (Tabla 18) sólo los factores simples son significativos ($P < 0.05$) en el crecimiento medio de la misma.

Tabla 17: ANOVA del crecimiento de FOG1; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T) y su interacción ($a_w \times T$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-valor
a_w	4	2097.17	58.36	0.0000*
T	1	488.82	13.60	0.0000*
$a_w \times T$	4	101.74	2.83	0.0268*

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor
* Significativo $P < 0.05$

Tabla 18: ANOVA del crecimiento de FOG2; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T) y su interacción ($a_w \times T$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-valor
a_w	4	2551.92	49.23	0.0000*
T	1	267.308	5.16	0.0247*
$a_w \times T$	4	78.0476	1.51	0.2038

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor
* Significativo $P < 0.05$

También se han representado los gráficos de intervalos LSD de comparación de medias para la a_w y la T de cada una de las cepas, y los podemos observar en las Figuras 37 y 38.

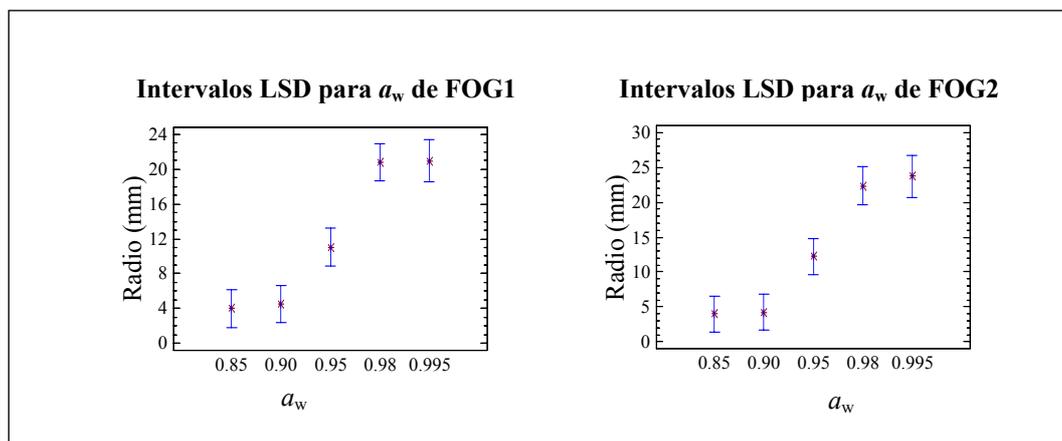


Figura 37: Intervalos LSD de comparación de medias para el factor a_w de FOG1 y FOG2.

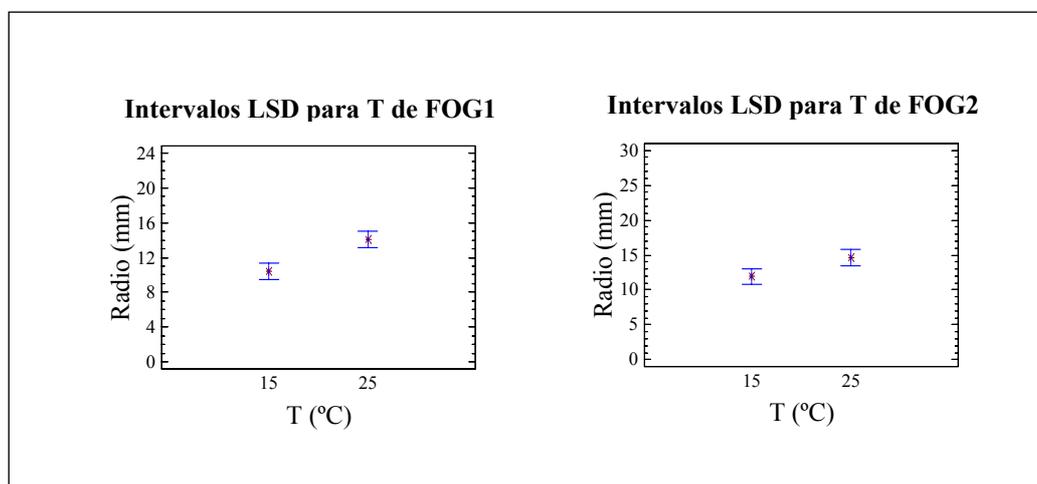


Figura 38: Intervalos LSD de comparación de medias para el factor T de FOG1 y FOG2.

En este caso no se hará ningún comentario a los gráficos de intervalos LSD, puesto que la conclusión, para $P < 0.05$, que se extrae de ellos es la misma que se ha expuesto para las cepas FOL1 y FOL2 en el apartado anterior.

Las Figuras 39 y 40 contienen una serie de fotografías del crecimiento mostrado por las cepas FOG1 y FOG2 a las diferentes a_w y T ensayadas.

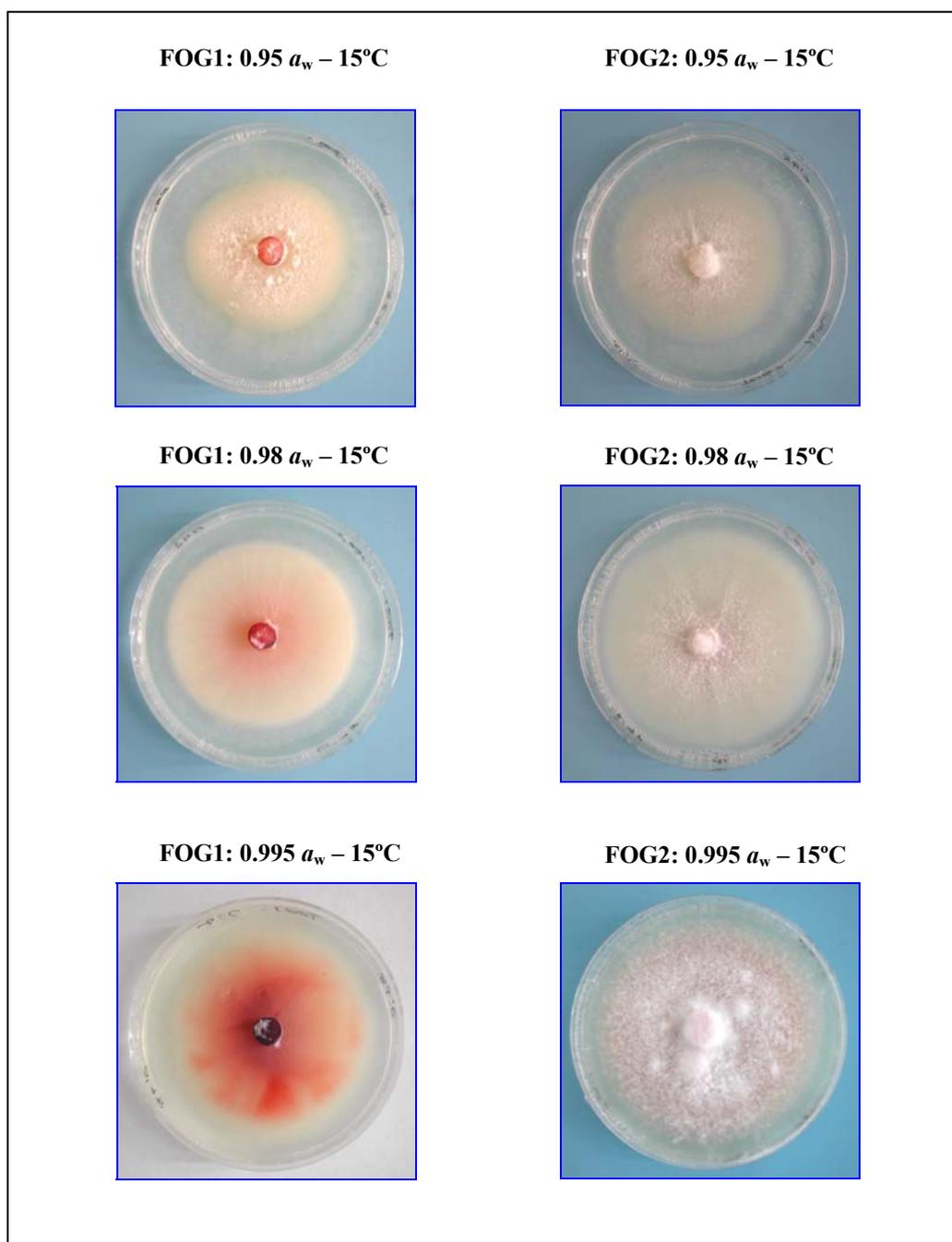


Figura 39: Crecimiento individual de FOG1 (izda.) y FOG2 (dcha.) a las distintas a_w y 15°C.

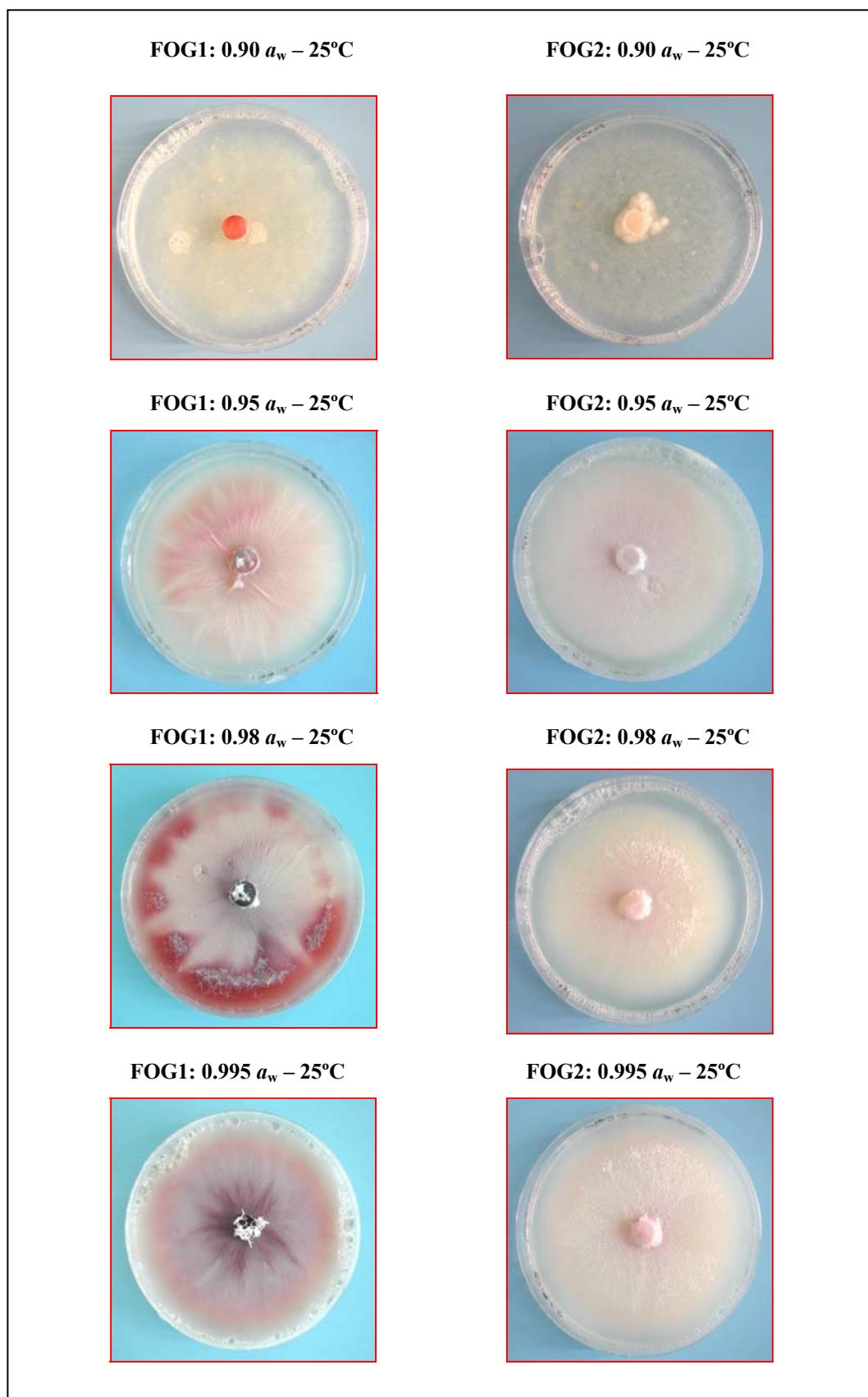


Figura 40: Crecimiento individual de FOG1 (izda.) y FOG2 (dcha.) a las distintas a_w y 25°C.

5.2.- Efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre la velocidad de crecimiento de las cepas estudiadas en las interacciones fúngicas

Los factores abióticos que afectan al crecimiento fúngico son principalmente la actividad de agua y la temperatura, por lo que su estudio es de gran interés para comprender la ecología de las diferentes especies fúngicas en sus relaciones con otras especies.

En los Anexos B y C se adjuntan de forma gráfica los resultados obtenidos del efecto de la a_w y la T en el crecimiento de las cepas objeto de estudio cuando son enfrentadas, dos a dos, en las interacciones interespecíficas: PO-FOL1, PO-FOL2, PO-FOG1, PO-FOG2, TH-RS, TH-FOL1 y TH-VD. En las Figuras de los Anexo B y C se representa el crecimiento radial (mm) de cada una de las cepas enfrentadas en función del tiempo y condición de a_w y T ensayada, con sus correspondientes rectas de regresión.

5.2.1.- Interacción *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 - *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715

Los resultados del estudio del crecimiento entre PO y FOL1, bajo las diferentes condiciones ensayadas se pueden observar en la Tabla 21 y gráficamente en la Figura 44. En la Figura 44 se representan las ratios de crecimiento (mm/día) de cada especie fúngica para cada a_w y T. Estos valores se han obtenido a partir del ajuste de las rectas de regresión de las Figuras B-1 y B-2 del Anexo B.

Tabla 21: Ratios de crecimiento (mm/día) de PO y FOL1 en crecimiento dual a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w).

		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO	0.78	2.10	3.72	5.32	3.08
	FOL1	0.00	0.33	2.43	4.66	6.32
15°C	PO	0.00	0.69	1.48	1.54	1.35
	FOL1	0.00	0.00	1.13	2.40	4.28

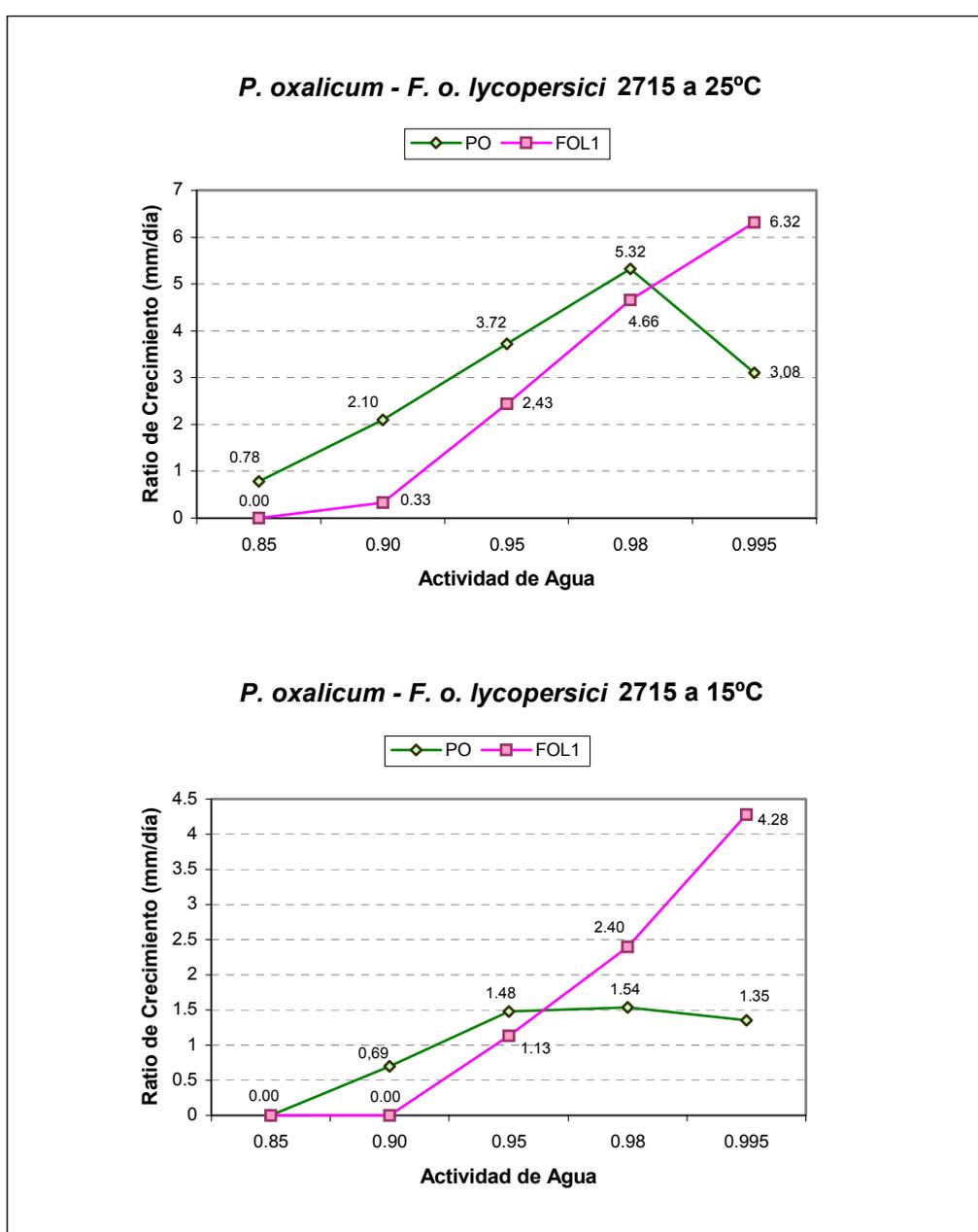


Figura 44: Influencia de la a_w sobre la velocidad de crecimiento en la interacción PO-FOL1 en función de la temperatura.

En la cepa PO, el crecimiento óptimo se produce a la temperatura de 25°C y a la a_w de 0.98, donde alcanza el valor de 5.32 mm/día (Figura 44). Estos resultados coinciden con los observados por distintos autores para la mayoría de las especies de *Penicillium* (Companys, 1996; Lacey y Magan, 1991; Marín y col., 1998 a). A partir de este valor de a_w , el crecimiento fúngico de PO disminuye, tanto si la disponibilidad de agua del medio aumenta (0.995 a_w) como si ésta disminuye (0.85, 0.90 y 0.98 a_w), y dicho crecimiento es muy lento a la a_w de 0.85, donde no llega a alcanzar 1 mm/día (0.78 mm/día); comportamientos similares fueron observados en otras especies de *Penicillium* por Ayerst (1969), Companys (1996) y Lacey y Magan (1991). Por otra parte, y del mismo modo que reseñó Sáenz (1996), se observa que los valores que se alcanzan a 0.95 de a_w son mayores que los obtenidos para una a_w de 0.995.

Cuando PO se hace crecer a la temperatura de 15°C, se obtienen siempre ratios de crecimiento menores que a la temperatura de 25°C. También a esta temperatura, es la a_w de 0.98 donde se obtiene el máximo crecimiento de la cepa (1.54 mm/día), coincidiendo esta a_w con la reseñada por Companys (1996) y Marín y col. (1998 a). Por debajo de 0.90 de a_w y a esa misma temperatura ya no hay crecimiento de la cepa. Companys (1996) y Marín y col. (1998 a), en otras especies de *Penicillium*, observaron que el menor crecimiento se daba a 0.90 de a_w y, al igual que nosotros, a la a_w de 0.85 tampoco obtuvieron crecimiento.

Respecto a la cepa FOL1 (Figura 44), ésta presenta un desarrollo similar a las dos temperaturas. La velocidad de crecimiento es máxima para valores de a_w de 0.995, siendo éstos de 6.32 mm/día a 25°C y de 4.28 mm/día a 15°C. Estos resultados coinciden con los observados por Lacey y Magan (1991), que sitúan también en ese intervalo a la mayoría de las especies del género *Fusarium*.

En las experiencias realizadas a 25°C se observa que a medida que la a_w disminuye por debajo de 0.95, el crecimiento fúngico sufre una importante caída siendo nulo a 0.85; por ello podemos considerar a 0.90 como valor más bajo de a_w ensayada donde se produce crecimiento de la cepa (0.33 mm/día). Observaciones similares han sido reseñadas en otras especies de *Fusarium* por Companys (1996), Frisvad y Samson (1991), Lacey y Magan (1991) y Marín y col. (1995, 1998 a).

A la temperatura de 15°C, el menor valor de crecimiento es de 1.13 mm/día y se corresponde con la a_w de 0.95. No obstante en otros *Fusarium* y a 0.90 de a_w se ha visto que pueden crecer (Companys, 1996; Marín y col., 1998 a).

En la interacción formada por PO-FOL1 (Figura 44) se aprecia que la cepa FOL1, tanto a 15 como a 25°C y a la a_w de 0.995 presenta mayores ratios de crecimiento que PO. Sin embargo ese dominio de FOL1 hacia PO cambia totalmente cuando las condiciones son a 0.98 de a_w y 25°C, situándose PO por encima de FOL1 al presentar ratios de crecimiento mayores. Este predominio de PO se mantiene en toda la experiencia a medida que disminuye la a_w . A 15°C también PO llega a situarse por encima de FOL1 y esto se produce cuando la a_w desciende al valor de 0.95.

En la Figura 45 se representa la pauta de crecimiento mostrada por ambas cepas cuando se hicieron crecer de forma individual y dual.

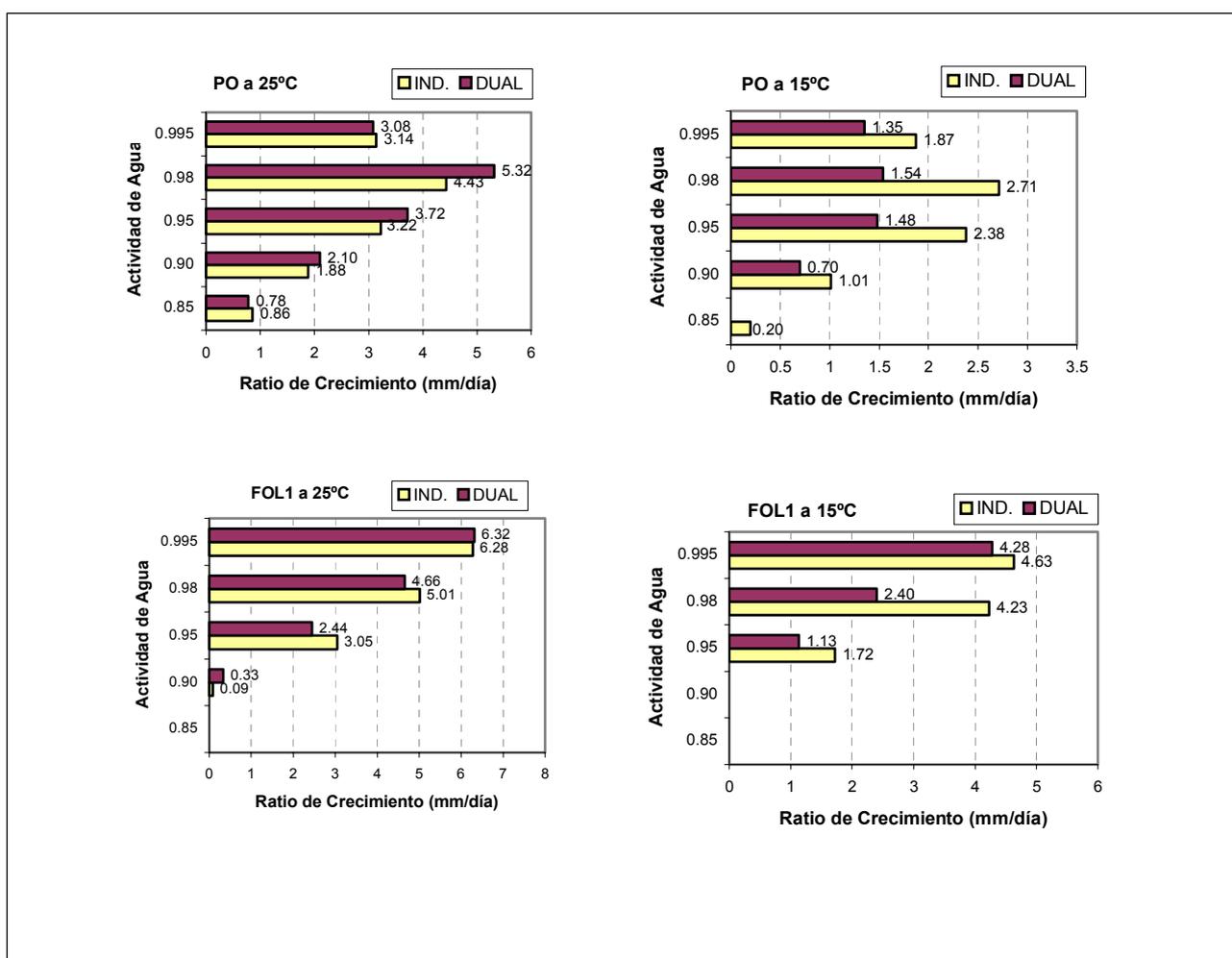


Figura 45: Comportamiento del crecimiento de las cepas PO y FOL1 en el ensayo individual y dual a las a_w y T ensayadas.

La cepa FOL1 mostró, en casi todos los casos, mayores ratios de crecimiento en los ensayos de crecimiento individual que cuando interaccionó dualmente, independientemente de la temperatura.

Respecto a la cepa PO, ésta presentó a 25°C valores de crecimiento algo mayores en el ensayo dual, a las a_w de 0.98, 0.95 y 0.90, que cuando creció de forma individual. Sin embargo a 15°C, es en el ensayo individual donde se alcanzan los mayores valores de crecimiento. El que PO presente mayores ratios de crecimiento en el ensayo dual a 25°C, nos indica que posee mayor habilidad para competir bajo un amplio rango de condiciones, siendo éstas las que le podrían permitir controlar a FOL1.

En la Tabla 22 se muestran los resultados del análisis de la varianza de los efectos de la a_w , la T, la E y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$, y $T \times E$) sobre el crecimiento medio de PO y FOL1 cuando ambas especies se hacen crecer en común. Este análisis demuestra el efecto significativo ($P \leq 0.05$) de todos los factores analizados sobre el crecimiento de las dos cepas.

Tabla 22: ANOVA del crecimiento dual PO-FOL1; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T), especie fúngica (E) y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$ y $T \times E$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-Valor
a_w	4	2612.19	52.22	0.0000 *
T	1	3089.67	61.76	0.0000 *
E	1	194.799	3.89	0.0491 *
$a_w \times T$	4	167.222	3.34	0.0104 *
$a_w \times E$	4	814.446	16.28	0.0000 *
$T \times E$	1	425.286	288.50	0.0037*

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor

* Significativo $P \leq 0.05$

Para completar el estudio estadístico, de la influencia de la a_w y la T sobre el crecimiento medio de ambas especies al ser enfrentadas, se representa el gráfico de intervalos LSD de comparación de medias para los diferentes niveles del factor E (Figura 46) y los gráficos de las interacciones $a_w \times E$ y $T \times E$ (Figuras 47 y 48).

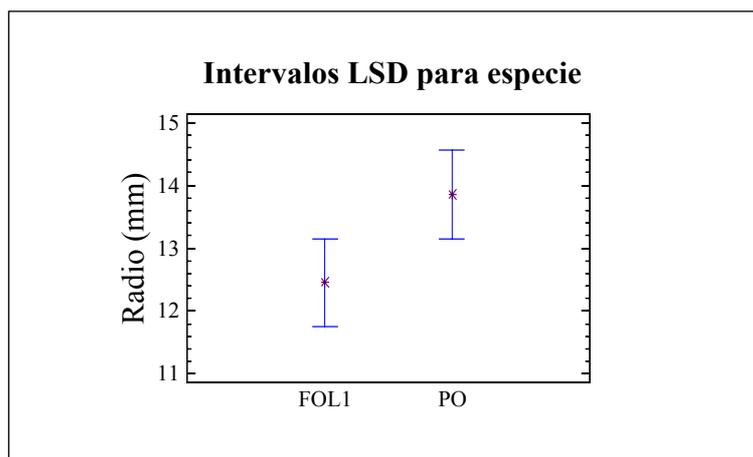


Figura 46: Intervalos LSD de comparación de medias para el factor E en PO-FOL1.

En el gráfico de intervalos LSD para el factor E (Figura 46) podemos comprobar que existen diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las medias de crecimiento de las dos especies estudiadas, siendo el crecimiento promedio de PO ligeramente mayor que el alcanzado por FOL1.

La representación gráfica de la interacción $a_w \times E$ (Figura 47) nos revela que la respuesta de ambas cepas a los cambios de a_w es distinta ($P \leq 0.05$). Se observa que la cepa FOL1 tiene una mayor respuesta cuando el nivel de a_w se sitúa a 0.995. Por el contrario, para los niveles 0.85, 0.90, 0.95 de a_w , es la cepa PO la que presenta un crecimiento medio mayor que FOL1. Se da la circunstancia que para un nivel de a_w de 0.98 las dos especies responden prácticamente de forma similar.

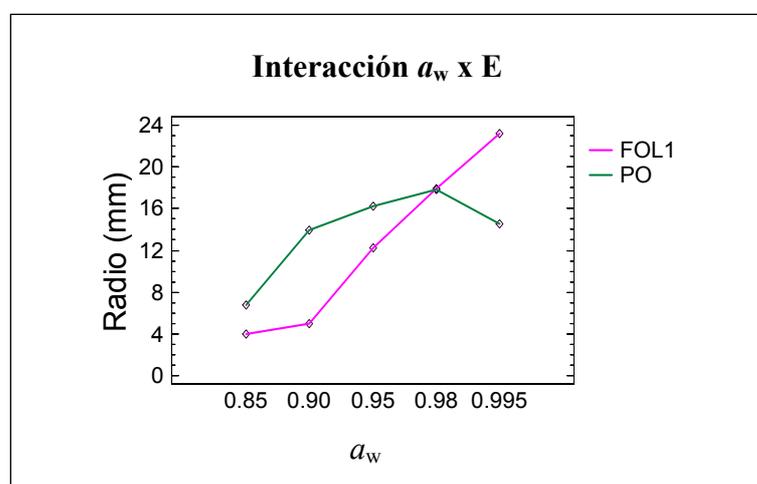


Figura 47: Gráfico de interacción entre los factores $a_w \times E$ en PO-FOL1.

Respecto a la interacción T x E, representada en la Figura 48, se aprecia que la respuesta de las dos especies es diferente ($P \leq 0.05$), según el nivel de T ensayado, mostrando PO un crecimiento más acentuado cuando la temperatura es de 25°C, y por tanto una respuesta más marcada a las oscilaciones en la T.

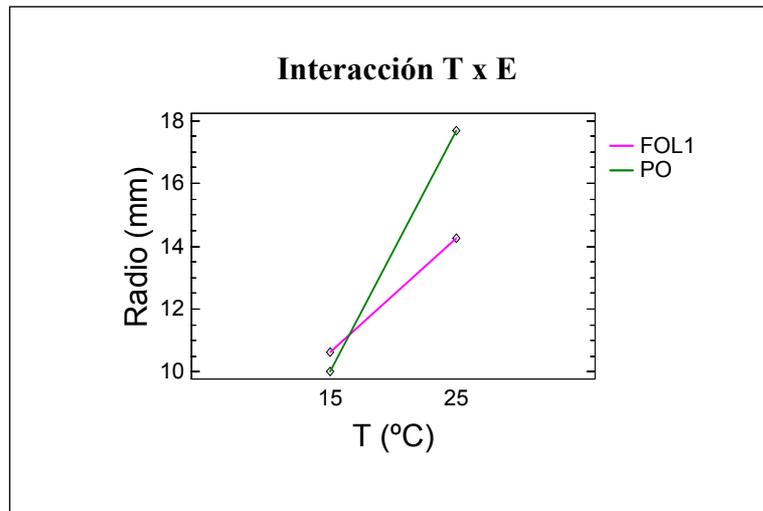


Figura 48: Gráfico de interacción entre los factores T x E en PO-FOL1.

Por ello, cuando ambas cepas crezcan en común en la naturaleza, y a la vista de los resultados obtenidos del estudio estadístico, podemos predecir que se producirá un predominio de PO sobre FOL1, en la mayoría de las condiciones ensayadas, excepto cuando la disponibilidad de agua del medio sea de 0.995, condición que favorece el desarrollo de FOL1, al tratarse de un género que se caracteriza por requerimientos elevados de a_w .

En las Figuras 49 y 50 se muestran una serie de fotografías correspondientes a las especies que componen esta interacción interespecífica, siendo siempre PO la colonia situada a la izquierda y FOL1 la situada a la derecha.

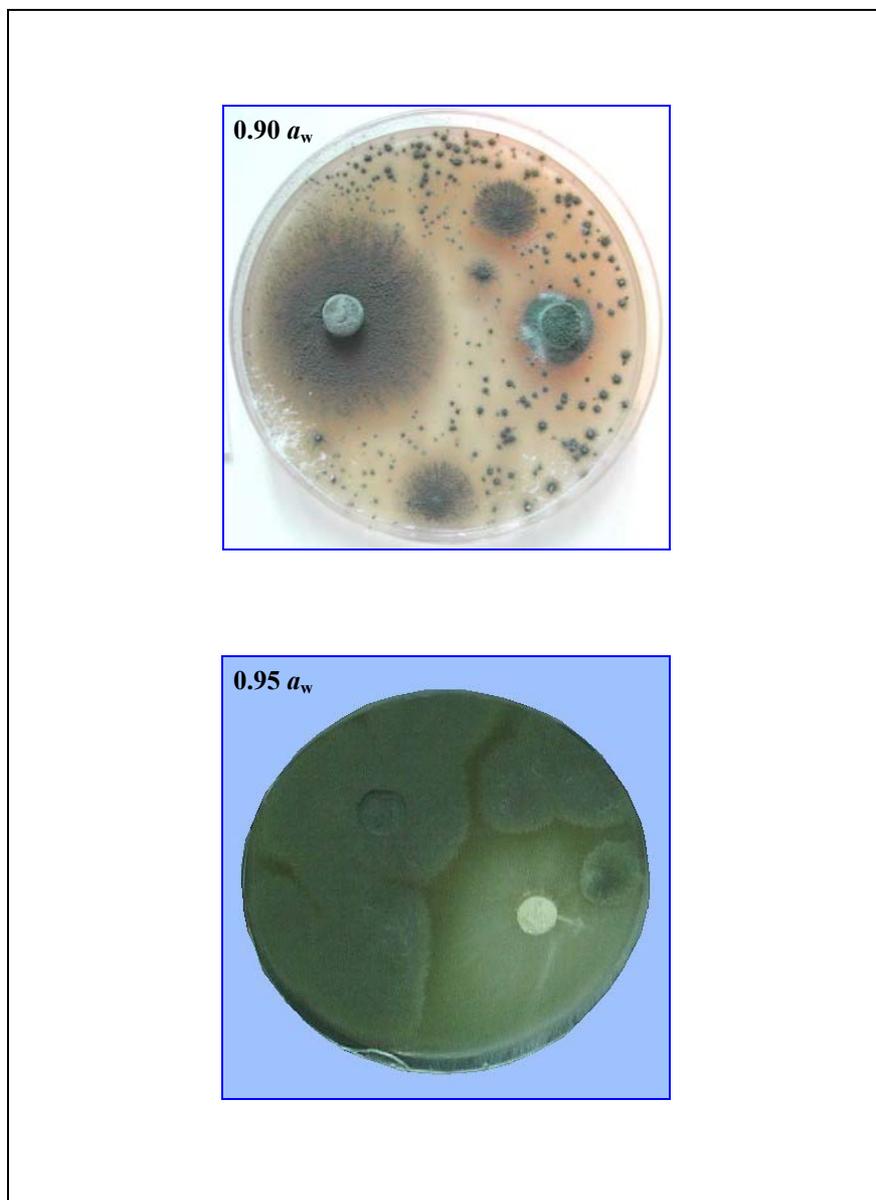


Figura 49: Crecimiento dual entre PO y FOL1 a 15°C y a las a_w de 0.90 y 0.95.

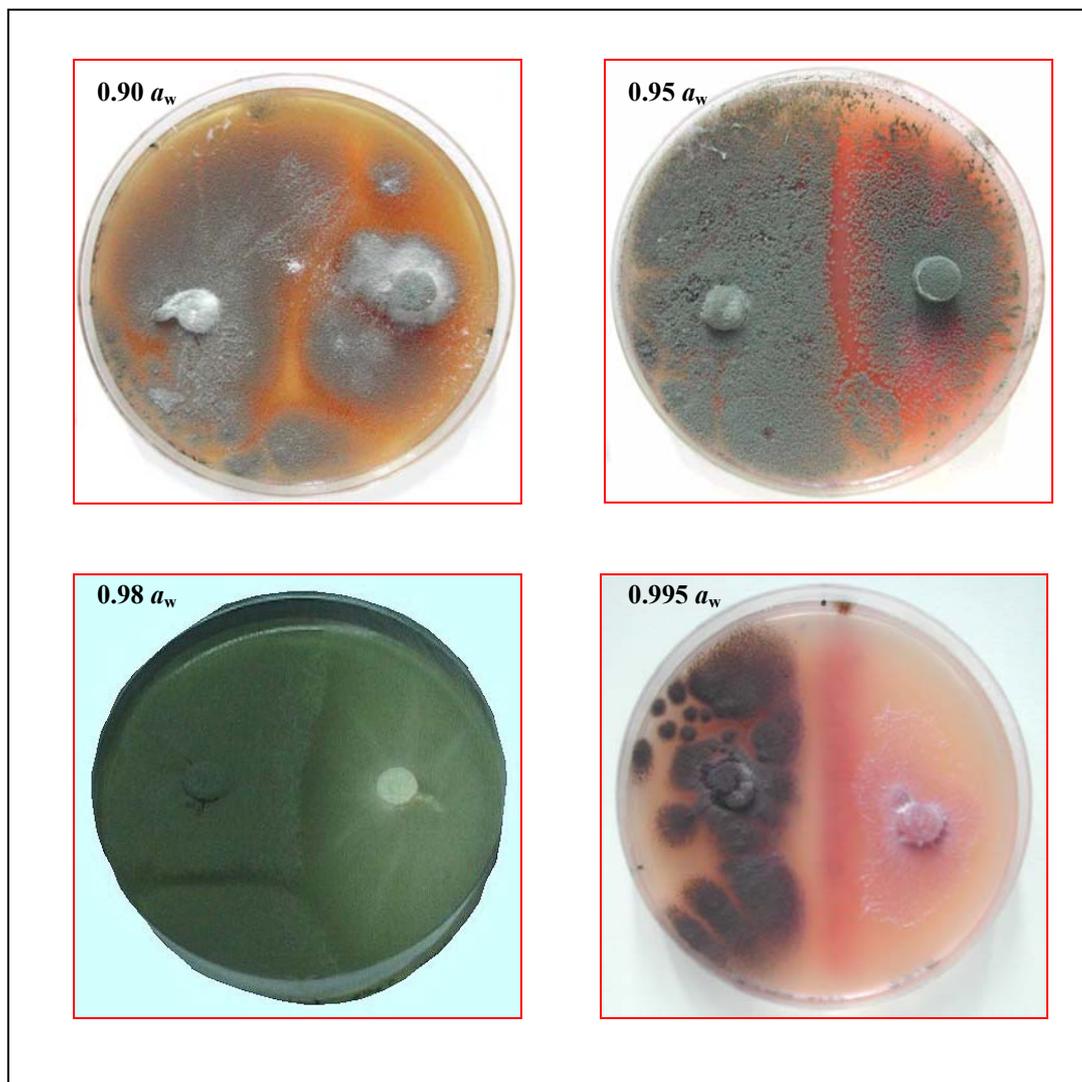


Figura 50: Crecimiento dual entre PO y FOL1 a 25°C y a las a_w de 0.90, 0.95, 0.98 y 0.995.

5.2.2.- Interacción *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 - *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2866

Los resultados del crecimiento dual entre PO y FOL2, a las a_w y T ensayadas, son los que se muestran en la Tabla 23 y gráficamente en la Figura 51, donde se representan las ratios de crecimiento (mm/día) de cada cepa fúngica para las distintas a_w y T. Las ratios de crecimiento se han obtenido a partir del ajuste de las rectas de regresión de las Figuras B-3 y B-4 del Anexo B.

Tabla 23: Ratios de crecimiento (mm/día) de PO y FOL2 en crecimiento dual a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w).

		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO	0.76	1.62	3.15	5.56	2.81
	FOL2	0.00	0.63	2.99	4.96	5.31
15°C	PO	0.00	0.68	1.32	2.12	1.20
	FOL2	0.00	0.00	1.23	2.82	3.11

Tal como se observa en la Figura 51 y en la Tabla 23, la cepa PO crece en todas las a_w ensayadas a 25°C, mientras que a 15°C no muestra crecimiento a la a_w más baja (0.85); comportándose, por tanto, del mismo modo que lo hizo en la interacción PO-FOL1.

El máximo crecimiento de esta cepa se alcanza a la temperatura de 25°C y para una a_w de 0.98 (5.56 mm/día). Además, a medida que disminuye la disponibilidad de agua también lo hace el crecimiento fúngico, siendo muy bajo a la a_w de 0.85 (0.76 mm/día). Diversos autores obtienen resultados semejantes en otras especies de *Penicillium*, tal y como indicamos en la interacción PO-FOL1 anteriormente expuesta en el apartado 5.2.1.

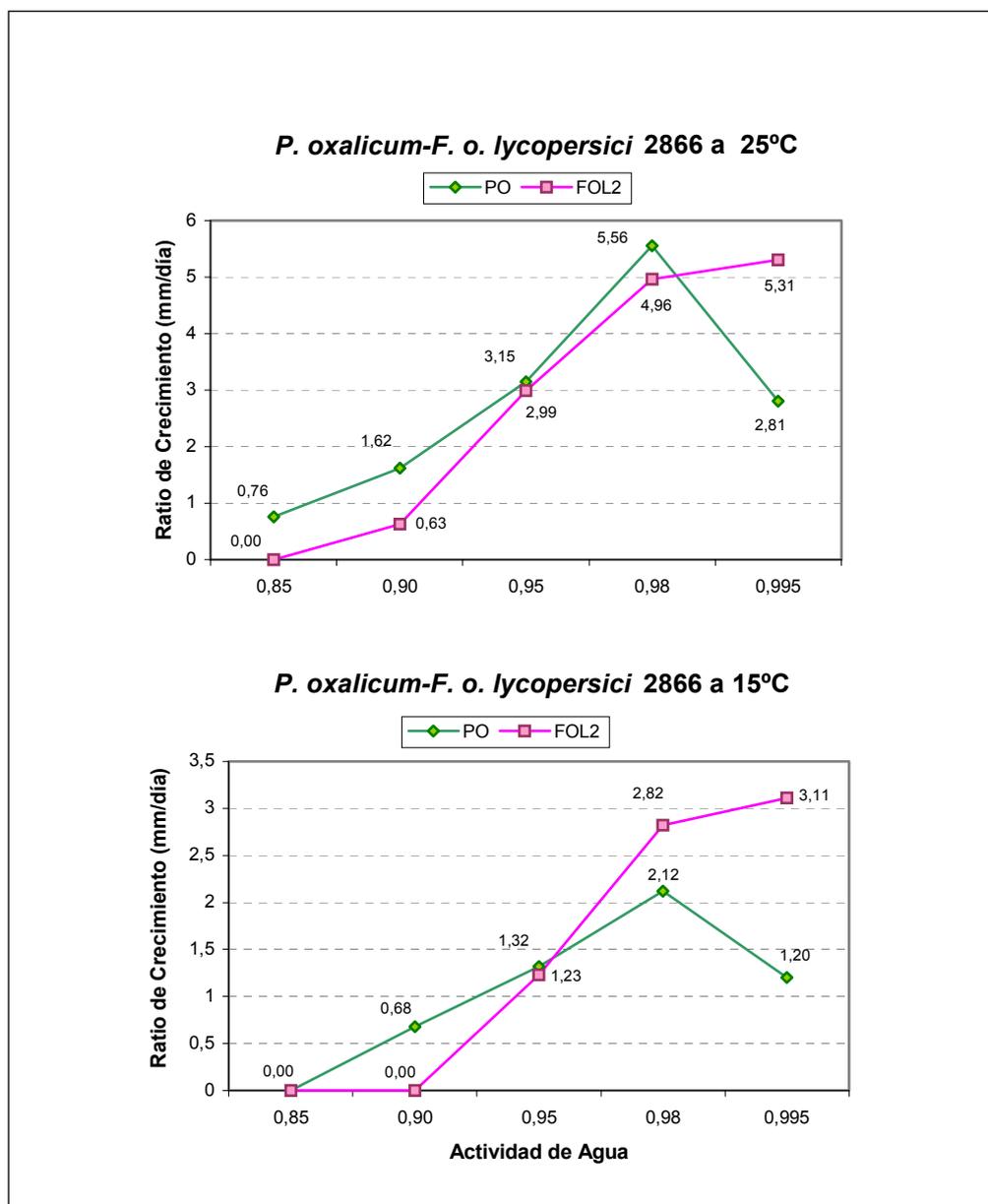


Figura 51: Influencia de la a_w sobre la velocidad de crecimiento en la interacción PO-FOL2 en función de la temperatura.

Las ratios de crecimiento de la cepa PO a la temperatura de 15°C son menores que las obtenidas a 25°C. La velocidad óptima de crecimiento se produce nuevamente a la a_w de 0.98 (2.12 mm/día), siendo el desarrollo de esta cepa a 0.90 de a_w muy bajo (0.68 mm/día).

En la cepa FOL2 el intervalo de crecimiento a 25°C está comprendido entre 0.90 y 0.995 de a_w , mientras que a 15°C este intervalo se sitúa entre 0.95 y 0.995 de a_w (Figura 51). A la a_w de 0.995 es donde FOL1 obtiene el máximo de crecimiento, lográndose valores de 5.31 mm/día a 25°C y de 3.11 mm/día a 15°C.

Asimismo, a 25°C y a partir de 0.95 de a_w , se observa un importante descenso en el crecimiento fúngico al disminuir la a_w , con valores muy bajos a 0.90 de a_w (0.63 mm/día) y llegando a ser nulo para una a_w de 0.85. No obstante, a 15°C la a_w ensayada donde el crecimiento ha sido más bajo es a 0.95 y el valor que se obtiene es de 1.23 mm/día. El desarrollo que muestra la cepa FOL2 en esta interacción interespecífica es semejante al de la cepa FOL1 de la interacción anteriormente comentada.

En la interacción compuesta por PO-FOL2 (Figura 51), la cepa FOL2 presenta mayores ratios de crecimiento que PO cuando las condiciones de a_w son de 0.995 a 25°C y de 0.98 y 0.995 a 15°C. Esta situación cambia a favor de PO cuando a 25°C la a_w es de 0.98 o inferior a 0.95. Por otra parte, tanto a 15 como a 25°C y para una a_w de 0.95 no se aprecian prácticamente diferencias entre las ratios de crecimiento de las dos cepas enfrentadas; por lo que en esas condiciones las dos especies podrían competir pero sin predominio de una sobre la otra.

En el diagrama de barras de la Figura 52 se comparan los resultados del estudio individual de cada cepa con los obtenidos por las mismas cuando se hicieron crecer en común.

Ambas cepas obtuvieron a 15°C mayores ratios de crecimiento en el ensayo individual que en el dual. No obstante a 25°C estos valores fueron muy parecidos en los dos ensayos, individual y dual, excepto en la cepa PO que a 25°C y para 0.98 de a_w presentó valores de crecimiento mayores en el estudio dual que en el individual, siendo esas condiciones las que le pueden favorecer para controlar a FOL2.

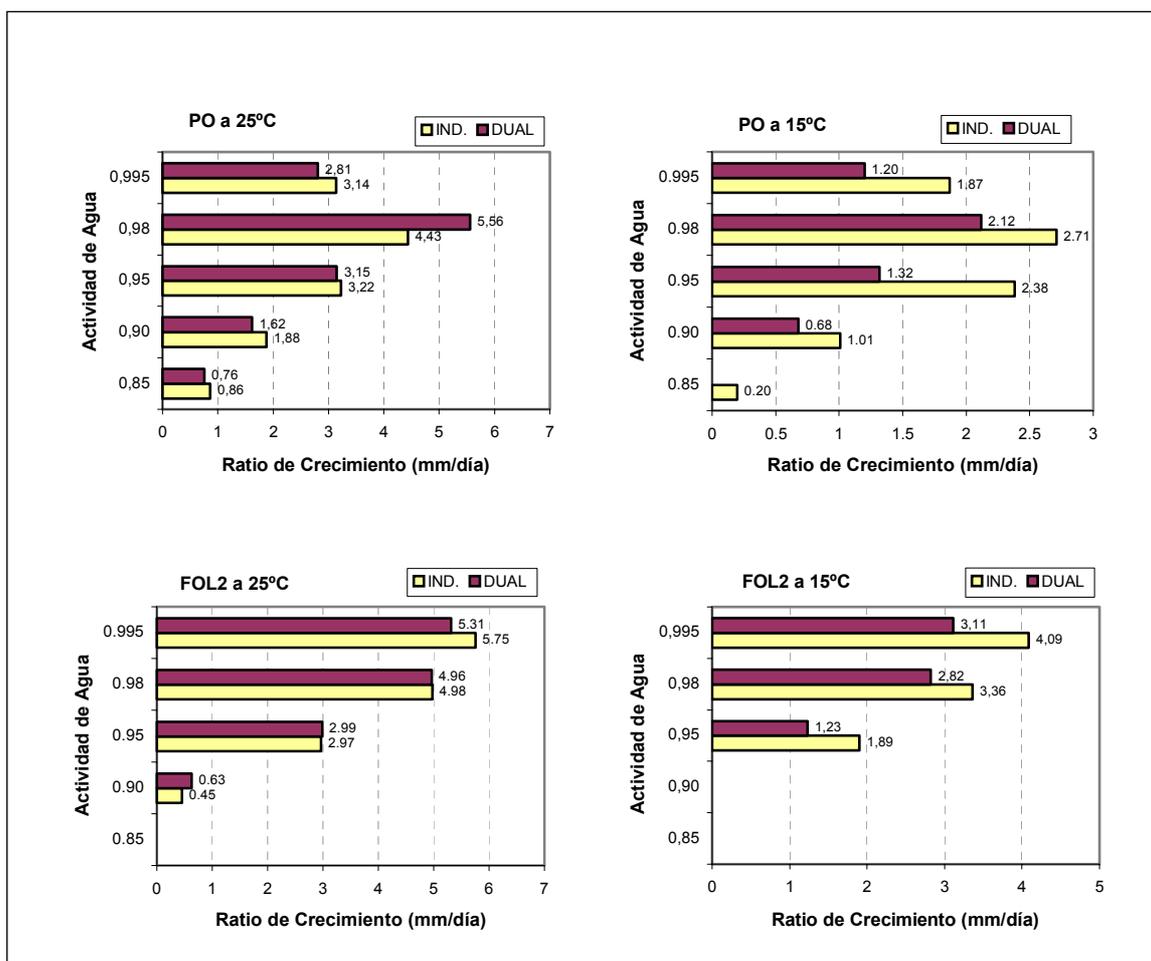


Figura 52: Comportamiento del crecimiento de las cepas PO y FOL2 en el estudio individual y dual a las a_w y T ensayadas.

La Tabla 24 contiene los resultados del análisis de la varianza de los efectos de la a_w , la T, la E y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$, $T \times E$) sobre el crecimiento medio de PO y FOL2 cuando ambas especies crecen en común. El análisis nos indica que los factores simples a_w y T y las interacciones dobles $a_w \times T$ y $a_w \times E$ tienen efecto significativo ($P < 0.05$) sobre el crecimiento medio de las cepas, pero no el factor E ni la interacción doble T x E.

Tabla 24: ANOVA del crecimiento dual PO-FOL2; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T), especie fúngica (E) y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$ y $T \times E$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-Valor
a_w	4	2857.23	74.96	0.0000*
T	1	2281.28	59.85	0.0000*
E	1	30.9409	0.81	0.3683
$a_w \times T$	4	128.291	3.37	0.0102*
$a_w \times E$	4	383.827	10.07	0.0000*
T \times E	1	0.959476	0.03	0.8740

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor
* Significativo $P < 0.05$

El gráfico de intervalos LSD para el factor E representado en la Figura 53 nos confirma gráficamente que realmente no existen diferencias significativas entre las medias de crecimiento de las dos especies analizadas.

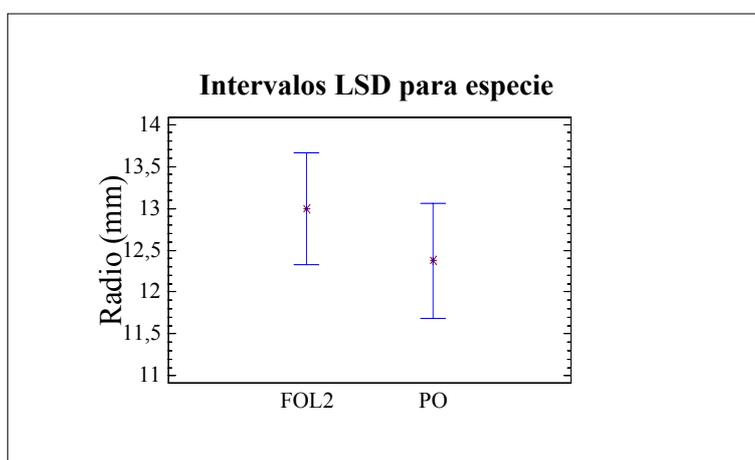


Figura 53: Intervalos LSD de comparación de medias para el factor E en PO-FOL2.

En la Figura 54 podemos observar de forma gráfica la interacción formada por los factores simples $a_w \times E$. La respuesta de las especies según el nivel de a_w analizado es distinta ($P < 0.05$). Por una parte la cepa FOL2 presenta una respuesta mayor cuando

la a_w es de 0.98 y 0.995. Sin embargo, en los restantes niveles de a_w es la cepa PO la que muestra un crecimiento promedio mayor conforme aumenta este factor.

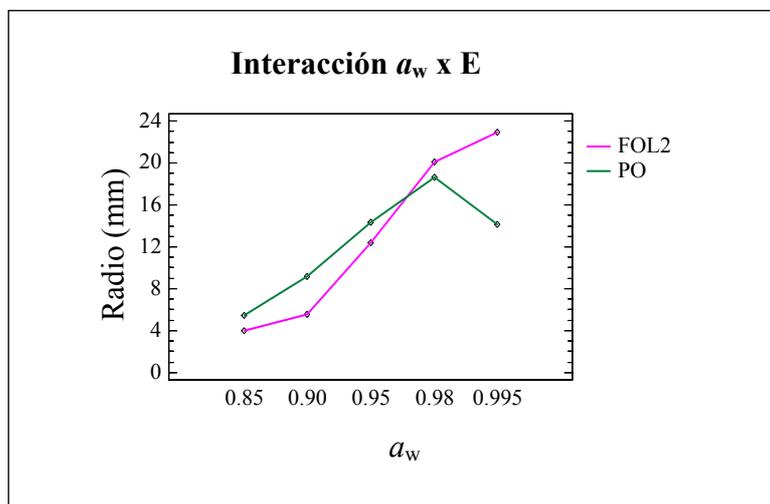


Figura 54: Gráfico de interacción entre los factores a_w x E en PO-FOL2.

El gráfico de la interacción T x E representado en la Figura 55 nos confirma, tal y como el ANOVA nos demostró, que realmente no es significativa la interacción, siendo la respuesta a los distintos niveles de T similar para ambas especies.

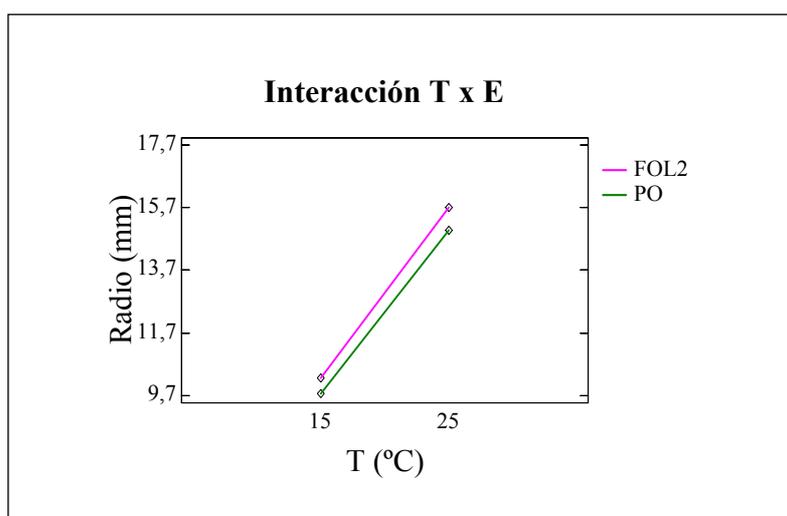


Figura 55: Gráfico de interacción entre los factores T x E en PO-FOL2.

En principio, de los resultados estadísticos se deduce que, cuando ambas cepas crezcan en común y entren en competencia en su propio hábitat, las a_w altas (0.98 y 0.995) favorecerán el desarrollo de FOL2 respecto al de PO.

Las Figuras 56 y 57 recogen una serie de imágenes de las especies que forman esta interacción interespecífica, siendo PO la colonia situada a la izquierda y FOL2 la situada a la derecha.

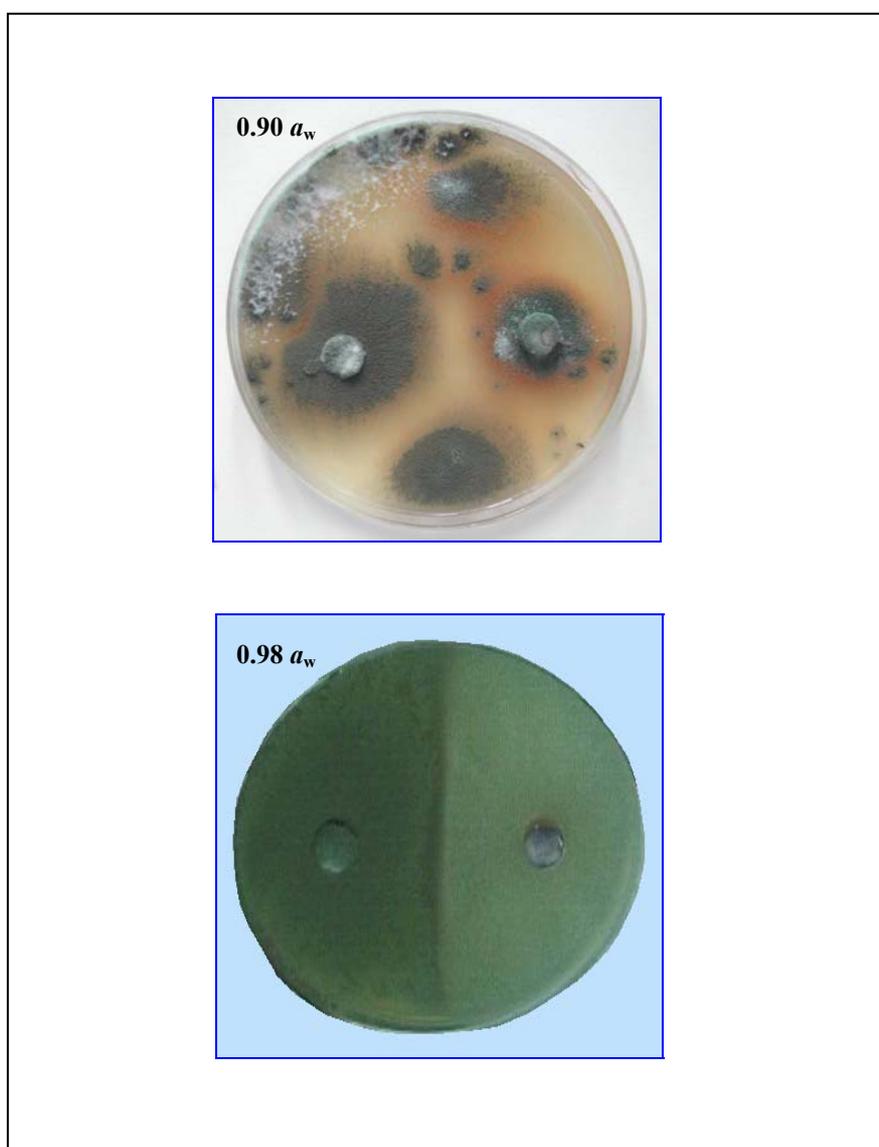


Figura 56: Crecimiento dual entre PO y FOL2 a 15°C y a las a_w de 0.90 y 0.98

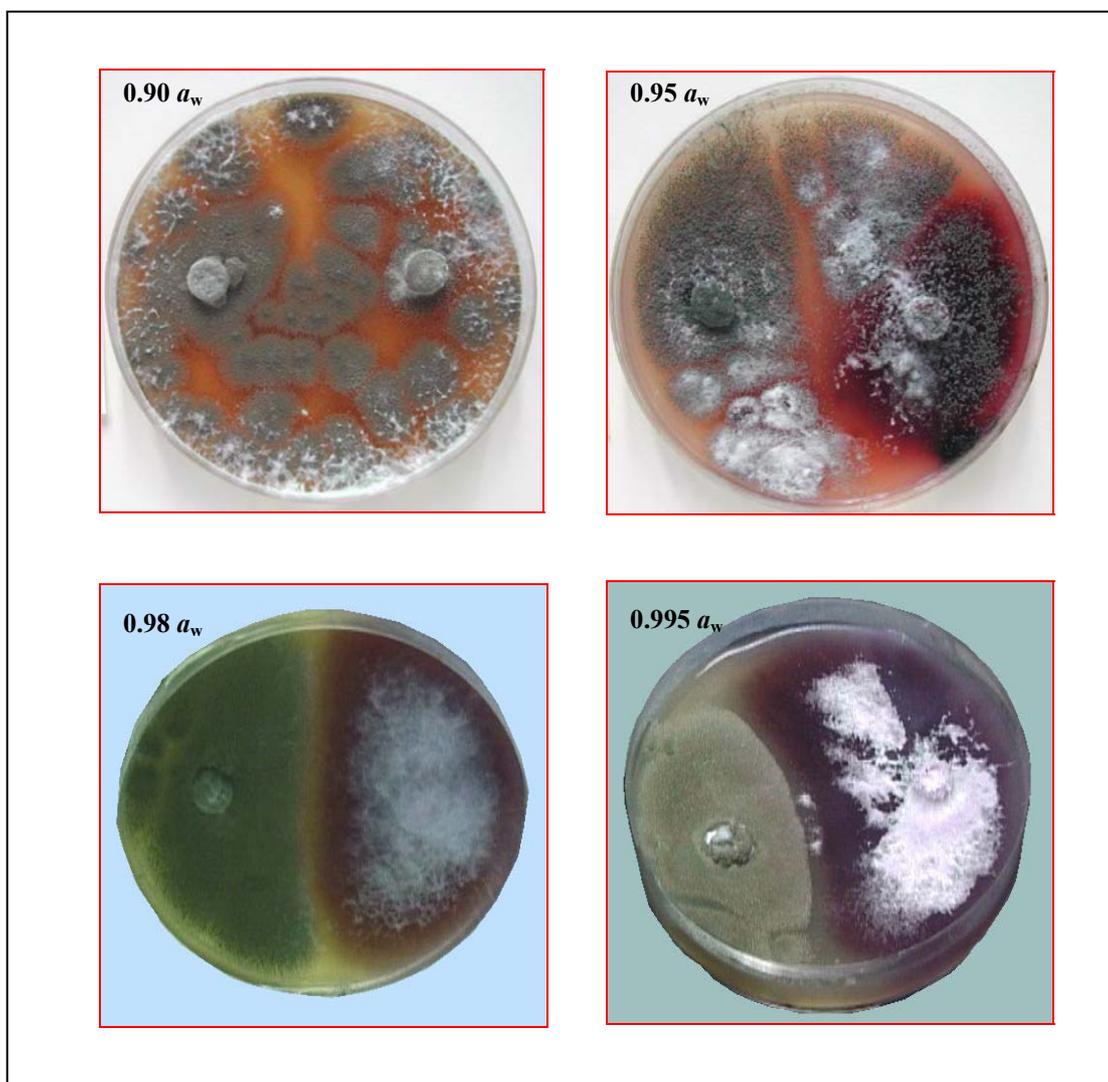


Figura 57: Crecimiento dual entre PO y FOL2 a 25°C y a las a_w de 0.90, 0.95, 0.98 y 0.995.

5.2.3.- Interacción *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 - *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* CECT 2867

Los resultados del estudio del crecimiento entre PO y FOG1, bajo las diferentes condiciones ensayadas son los que se reflejan en la Tabla 25 y de forma gráfica en la Figura 58, en la que se representan las ratios de crecimiento (mm/día) de cada especie fúngica para cada a_w en función de la temperatura. Las ratios de crecimiento se han obtenido a partir del ajuste de las rectas de regresión de las Figuras B-5 y B-6 del Anexo B.

Tabla 25: Ratios de crecimiento (mm/día) de PO y FOG1 en crecimiento dual a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w).

		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO	0.85	1.80	3.14	5.81	2.76
	FOG1	0.00	0.52	2.36	4.69	6.38
15°C	PO	0.16	0.85	1.12	2.09	0.91
	FOG1	0.00	0.11	1.30	2.53	3.15

La cepa PO en crecimiento dual con FOG1 crece en todas las a_w ensayadas, tanto en las experiencias realizadas a 15°C como a 25°C, y muestra el perfil de crecimiento representado en la Figura 58. Este hecho no se observó cuando se enfrentó PO con las cepas FOL1 y FOL2 a 15°C y para una a_w de 0.85.

La velocidad de crecimiento también ha sido óptima a la a_w de 0.98, y los valores obtenidos han sido de 5.81 mm/día a 25°C y de 2.09 mm/día a 15°C. El crecimiento a la a_w de 0.85 ha sido muy bajo, con valores de 0.85 y 0.16 mm/día a 25 y 15°C, respectivamente. Se observa que el desarrollo varía con la temperatura, a medida que ésta disminuye también lo hace el crecimiento fúngico, siendo a 15°C las ratios de crecimiento menores que a 25°C. Estos resultados coinciden en parte con los observados por otros autores para algunas especies de *Penicillium*, como indicamos en las anteriores interacciones entre PO y las cepas de *Fusarium oxysporum* estudiadas en este trabajo.

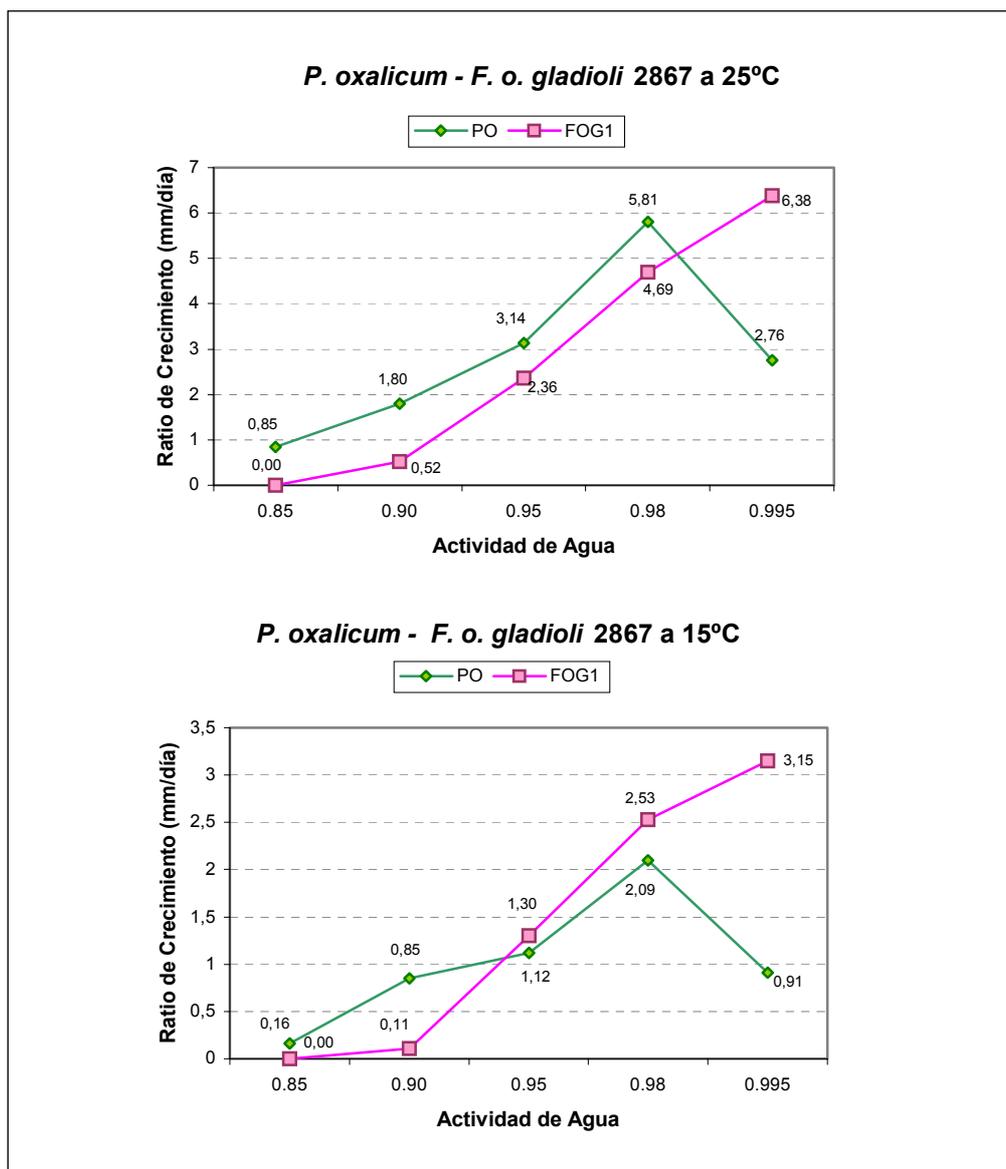


Figura 58: Influencia de la a_w sobre la velocidad de crecimiento en la interacción PO-FOG1 en función de la temperatura.

La cepa FOG1 también muestra una pauta similar en las dos temperaturas (Figura 58), y crece a las mismas a_w , siendo éstas las comprendidas entre 0.90 y 0.995. Indicar que la cepa FOG1, al igual que las especies de *Fusarium* estudiadas por Companys (1996) y Marín y col. (1998 a), ha mostrado desarrollo a la a_w de 0.90 cuando se hizo crecer a 15°C, mientras que las cepas FOL1 y FOL2 estudiadas en este trabajo no crecen en esas condiciones.

En FOG1 el máximo crecimiento se alcanza para una a_w de 0.995, con valores de 6.38 mm/día a 25°C y de 3.15 mm/día a 15°C, y es muy bajo para una a_w de 0.90, obteniendo valores de 0.52 y 0.11 mm/día a 25 y 15°C, respectivamente. Nuevamente, las mayores ratios de crecimiento se dan cuando la temperatura es de 25°C, por lo que es el descenso de la temperatura la que produce la disminución del crecimiento.

Cuando analizamos el crecimiento en común entre las dos cepas enfrentadas (Figura 58) se observa que a 25°C y cuando la a_w es de 0.995, la cepa FOG1 presenta ratios de crecimiento más altos que PO. Sin embargo, cuando la disponibilidad de agua es menor se ve favorecido el crecimiento de PO sobre FOG1, en las a_w comprendidas entre 0.85 y 0.98 a 25°C. La cepa PO a 15°C llega a situarse por encima de FOG1 cuando la a_w desciende al valor de 0.90 y/o 0.85. Posiblemente siempre que las condiciones de a_w no sobrepasen el valor de 0.98 a 25°C y el de 0.90 a 15°C, la cepa PO podría ser capaz de controlar a FOG1.

En la Figura 59 se puede observar el comportamiento que han mostrado ambas cepas cuando se hicieron crecer de forma individual y en común.

El comportamiento de la cepa FOG1 es, en general, similar en los dos ensayos, independientemente de la temperatura. A 25°C los valores que se alcanzan son muy parecidos tanto en el estudio dual como en el individual, excepto a la a_w de 0.995 donde presenta mayores ratios en el crecimiento dual. Sin embargo a 15°C siempre obtiene valores de crecimiento más altos en el ensayo individual que cuando crece dualmente.

En cuanto a la cepa PO, ésta mostró a 25°C ratios de crecimiento mayores a la a_w de 0.98 cuando creció de forma dual, mientras que los valores de crecimiento fueron prácticamente iguales en los dos estudios para las demás a_w ensayadas. Cuando la temperatura es de 15°C, los valores en el estudio individual superan ampliamente a los del estudio dual a las a_w de 0.95, 0.98 y 0.995.

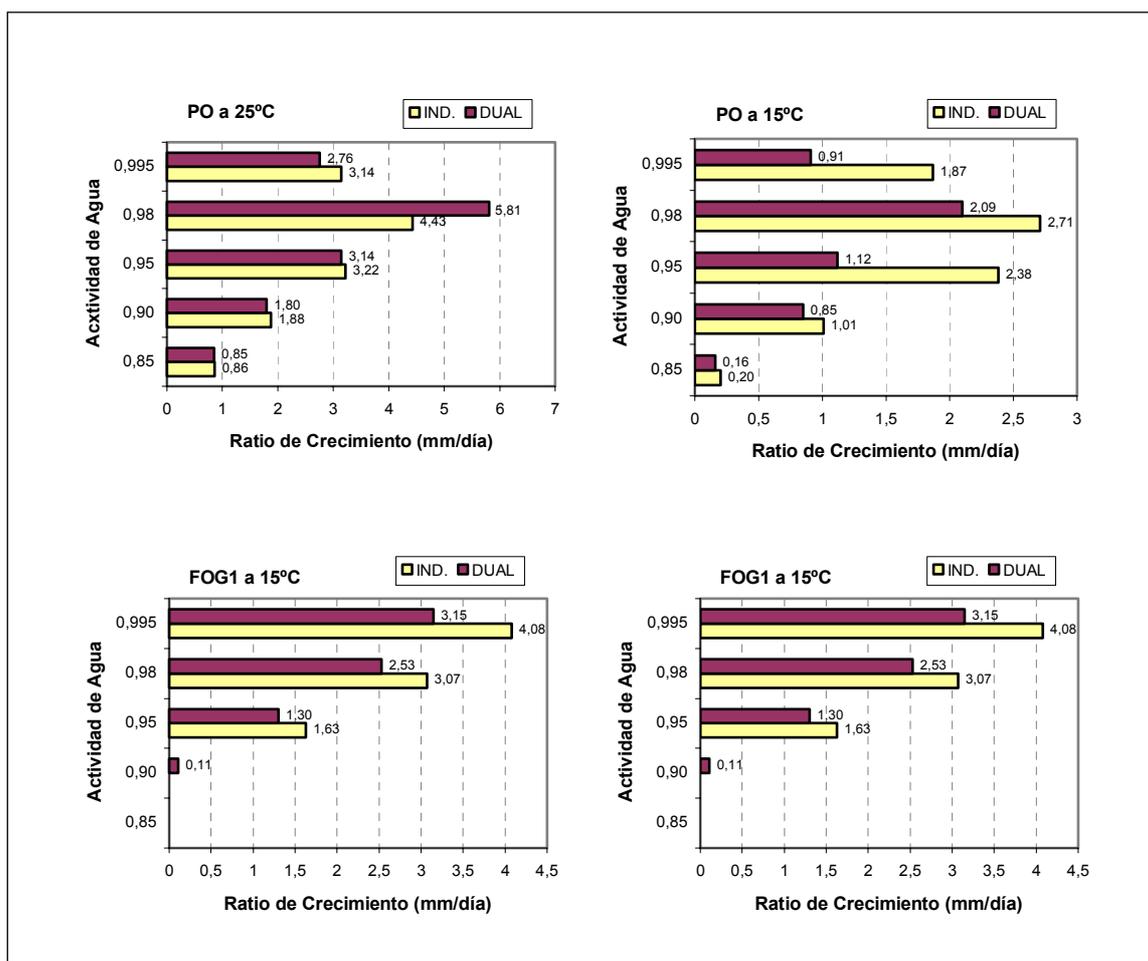


Figura 59: Comportamiento del crecimiento de las cepas PO y FOG1 en el ensayo individual y dual a las a_w y T ensayadas.

Los resultados del análisis de la varianza, del efecto de la a_w , la T, la E y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$, $T \times E$) sobre el crecimiento medio de PO y FOG1 al ser enfrentadas, son los que se recogen en la Tabla 26.

Este análisis nos indica que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) para todos los factores analizados sobre el crecimiento medio de las cepas, menos para el factor especie que no es significativa.

Tabla 26: ANOVA del crecimiento dual PO-FOG1; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T), especie fúngica (E) y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$ y $T \times E$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-Valor
a_w	4	4395.85	100.76	0.0000*
T	1	1638.53	37.56	0.0000*
E	1	0.041170	0.00	0.9616
$a_w \times T$	4	151.199	3.47	0.0125*
$a_w \times E$	4	1053.58	24.15	0.0000*
T \times E	1	377.811	8.66	0.0029*

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor

* Significativo $P < 0.05$

Se ha representado en la Figura 60 el gráfico de intervalos LSD de comparación de medias para el factor E. Dicho gráfico nos confirma que realmente no existen diferencias significativas entre los crecimientos promedios de las dos especies estudiadas.

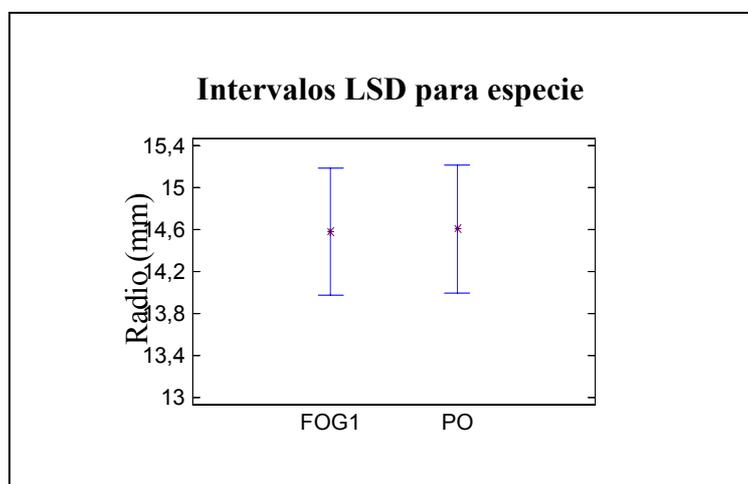


Figura 60: Intervales LSD de comparación de medias para el factor E en PO-FOG1.

En la Figura 61 se muestra el gráfico de la interacción compuesta por los factores simples $a_w \times E$.

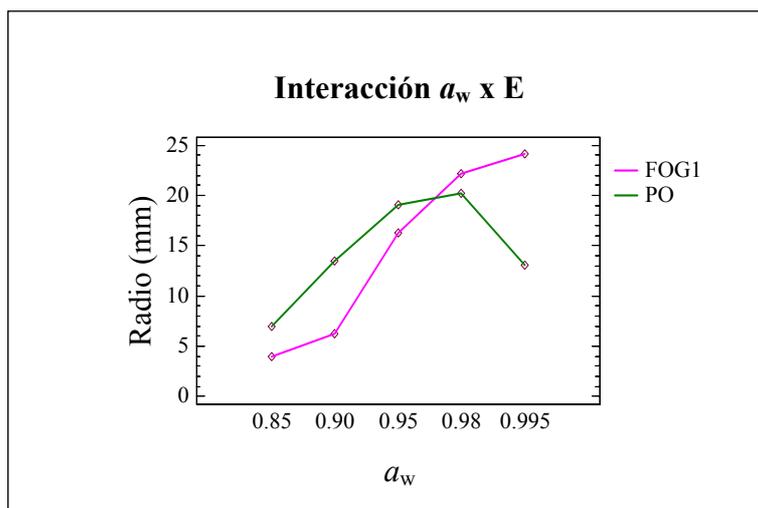


Figura 61: Gráfico de interacción entre los factores $a_w \times E$ en PO-FOG1.

En el gráfico se observa que cuando PO y FOG1 son enfrentados muestran una respuesta diferente ($P < 0.05$) según los distintos niveles de a_w , y es por ello que se produce la interacción entre estos factores. Se aprecia que la respuesta de la cepa FOG1 es mayor cuando los niveles de a_w son altos (0.98 y 0.995), siendo sustituida por PO en los restantes niveles de a_w .

Tal y como podemos ver en el gráfico de la Figura 62, donde se representa la interacción entre los factores T y E ($T \times E$) que el ANOVA ha dado como significativo ($P < 0.05$), la cepa PO responde con un crecimiento mayor al cambio de temperatura de 15 a 25°C, frente al mostrado por FOG1.

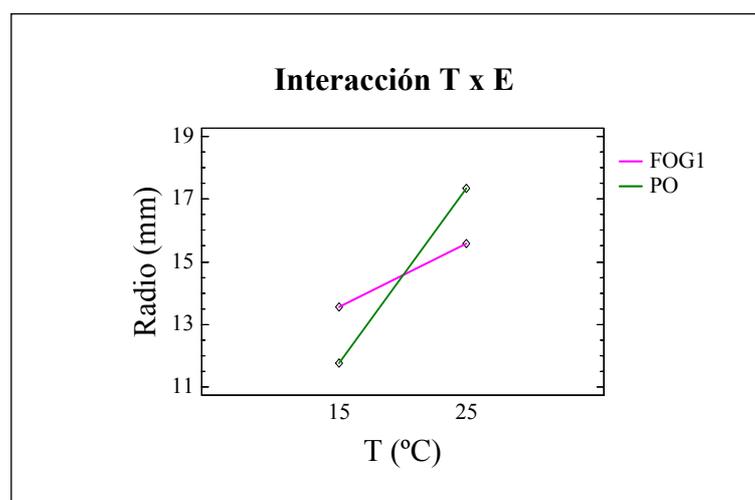


Figura 62: Gráfico de interacción entre los factores T x E en PO-FOG1.

De los resultados estadísticos se deduce que, cuando PO y FOG1 se enfrenten en condiciones medioambientales, se producirá una interacción entre ambas cepas con un predominio de PO sobre FOG1 cuando a 25°C la a_w oscile entre 0.85 y 0.95. A las a_w más elevadas (0.98 y 0.995) domina la cepa FOG1, al ser un género que requiere elevados niveles de agua para crecer.

Las Figuras 63 y 64 muestran una serie de fotografías de las especies que componen esta interacción interespecífica, siendo PO la colonia situada a la izquierda de la imagen y FOG1 la situada a la derecha.

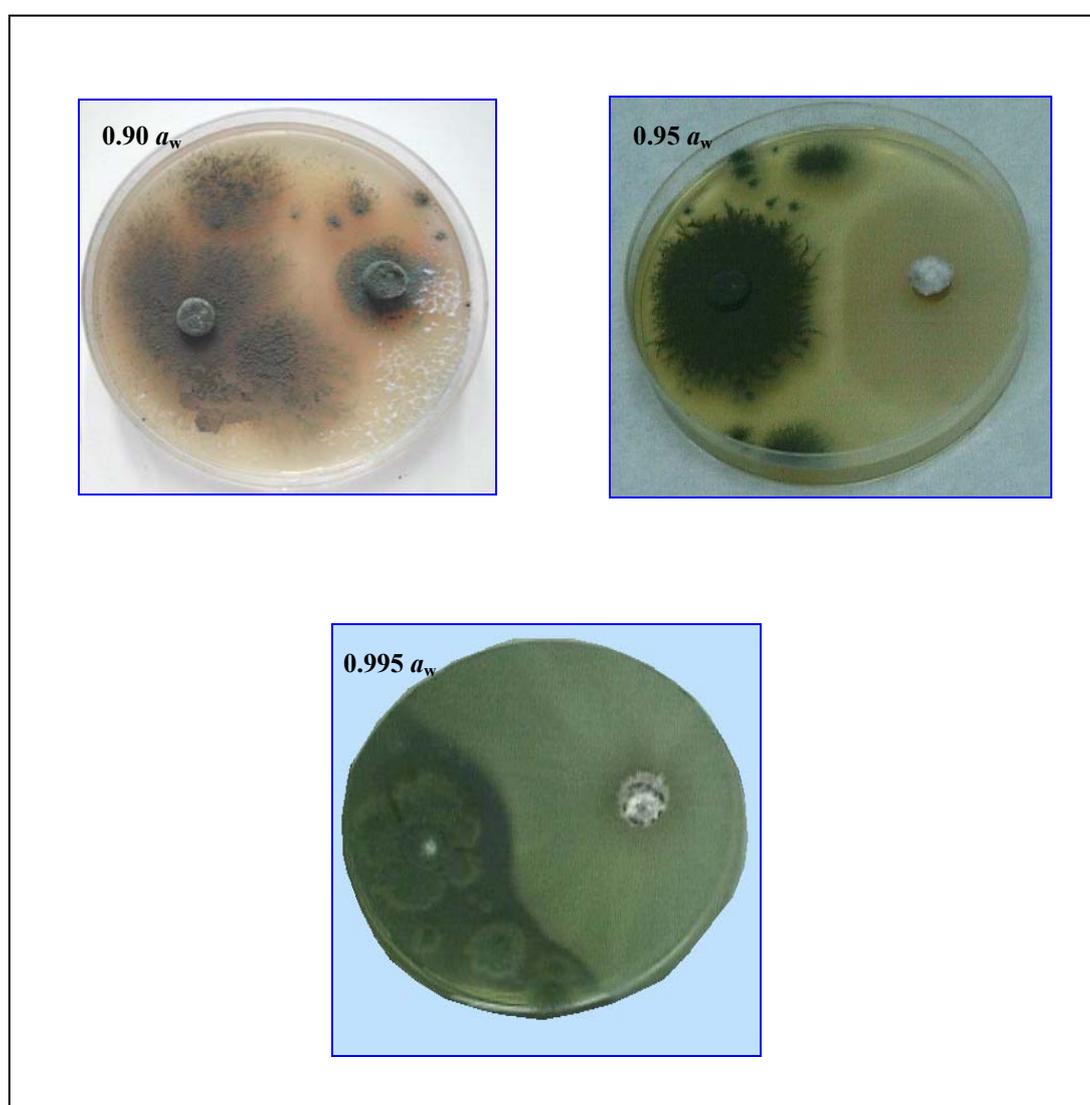


Figura 63: Crecimiento dual entre PO y FOG1 a 15°C y a las a_w de 0.90, 0.95 y 0.995.

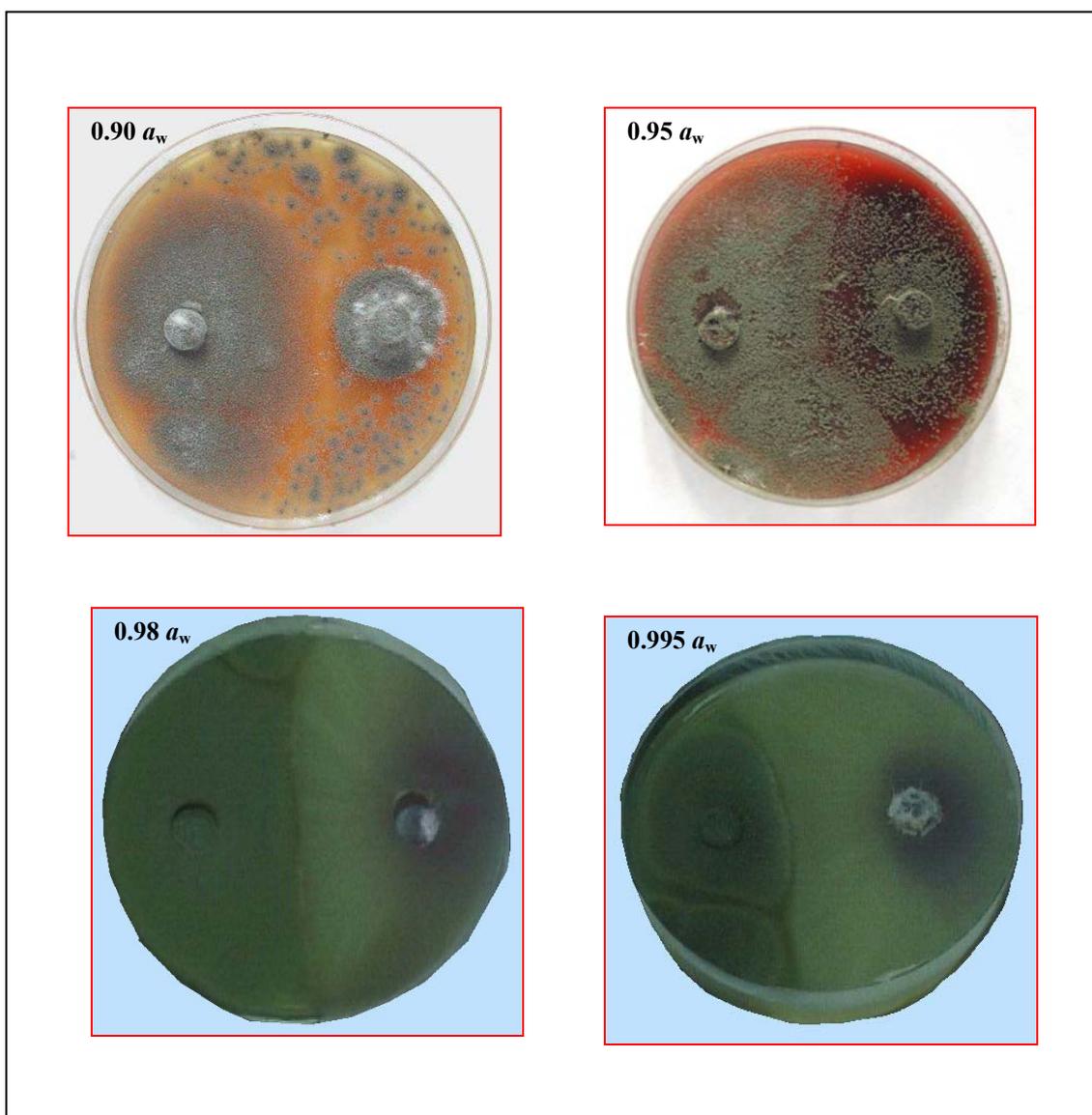


Figura 64: Crecimiento dual entre PO y FOG1 a 25°C y a las a_w de 0.90, 0.95, 0.98 y 0.995.

5.2.4.- Interacción *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 - *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* CECT 2868

Los resultados del estudio del crecimiento dual entre PO y FOG2, a las a_w y T ensayadas se muestran en la Tabla 27 y gráficamente en la Figura 65. Las ratios de crecimiento se han obtenido a partir del ajuste de las rectas de regresión de las Figuras B-7 y B-8 del Anexo B.

Tabla 27: Ratios de crecimiento (mm/día) de PO y FOG2 en crecimiento dual a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w).

		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO	0.72	1.94	3.56	6.21	2.86
	FOG2	0.00	0.19	2.44	4.49	6.51
15°C	PO	0.20	0.84	1.23	2.38	1.08
	FOG2	0.00	0.00	1.35	2.88	3.55

La cepa PO, al igual que en la interacción PO-FOG1, mostró un patrón de crecimiento similar en las dos temperaturas estudiadas, al crecer en todas las a_w y al presentar el óptimo de crecimiento para los mismos valores de a_w (Figura 65).

La ratio de crecimiento, de nuevo, es máxima a la a_w de 0.98, con valores de 6.21 mm/día a 25°C y de 2.38 mm/día a 15°C, mientras que para una a_w de 0.85, los valores que se obtienen son muy bajos, de 0.72 y de 0.20 mm/día a 25 y 15°C, respectivamente. También en esta interacción interespecífica se observa como varían las tasas de crecimiento con el descenso de la temperatura, siendo los valores de crecimiento más altos para la temperatura de 25°C.

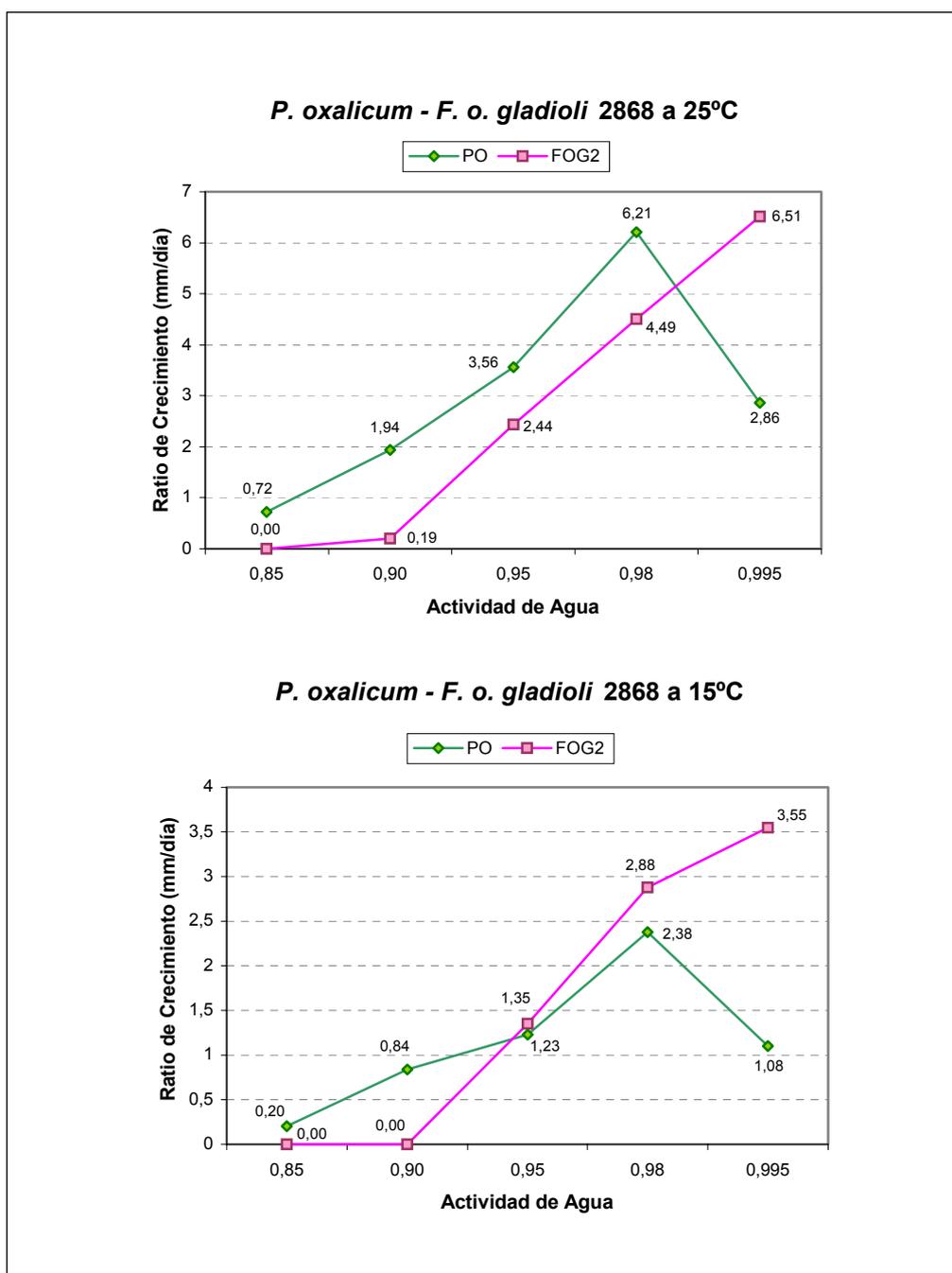


Figura 65: Influencia de la a_w sobre la velocidad de crecimiento en la interacción PO-FOG2 en función de la temperatura.

Respecto a la cepa FOG2 (Figura 65) el máximo crecimiento se produce a 25°C y cuando la disponibilidad de agua es alta (0.995 a_w), siendo el valor que se obtiene de 6.51 mm/día; resultado que coincide con los observados por Lacey y Magan (1991) que sitúan también en esa a_w a la mayoría de las especies del género *Fusarium*. Se aprecia

que cuando la disponibilidad de agua desciende, también lo hacen los ratios de crecimiento, siendo nula para la a_w de 0.85, y muy baja a 0.90 con un valor de 0.19 mm/día. Estos mismos resultados se han obtenido para las distintas formas especiales de *Fusarium oysporum* estudiadas dualmente en este trabajo.

En las experiencias realizadas a 15°C el óptimo también se alcanza para una a_w de 0.995 (3.55 mm/día), mientras que el valor más bajo de crecimiento obtenido es de 1.35 mm/día y se da para una a_w de 0.95. Esta cepa no mostró crecimiento en las a_w ensayadas de menor disponibilidad de agua. No obstante, la cepa FOG1 en crecimiento dual sí que mostró crecimiento. Además, se observa que el descenso de la temperatura de 25 a 15°C origina una disminución en el crecimiento fúngico de la cepa.

En la interacción formada por PO-FOG2 (Figura 65), la cepa FOG2 presenta mayores ratios de crecimiento que PO cuando las condiciones de a_w son de 0.995 a 25°C y de 0.98 y 0.995 a 15°C. Este predominio de FOG2 sobre PO cambia cuando a 25°C la a_w es igual o menor de 0.98, situándose PO por encima de FOG2 al presentar mayores ratios de crecimiento. A 15°C y para una a_w de 0.95 no se observan casi diferencias entre los valores de crecimiento de las dos cepas; por lo que creemos que en esas condiciones las dos especies podrían entrar en competencia pero no se produciría un predominio de una sobre la otra.

En el diagrama de barras de la Figura 66 se comparan los resultados del estudio individual y del dual de las cepas PO y FOG2.

En general, la cepa FOG2 dio lugar a ratios de crecimiento más altos en el estudio individual que cuando creció de forma dual, pero sobretodo cuando la experiencia se realizó a 15°C.

Respecto a la cepa PO, ésta presentó a 25°C mayores valores de crecimiento a la a_w de 0.98 cuando creció de forma dual, mientras que en las restantes a_w esos valores fueron prácticamente iguales o muy similares. Cuando la temperatura es de 15°C los valores en el ensayo individual han sido más altos que cuando creció dualmente, menos para la a_w de 0.85 en la que se obtuvo el mismo valor en los dos estudios, individual y dual.

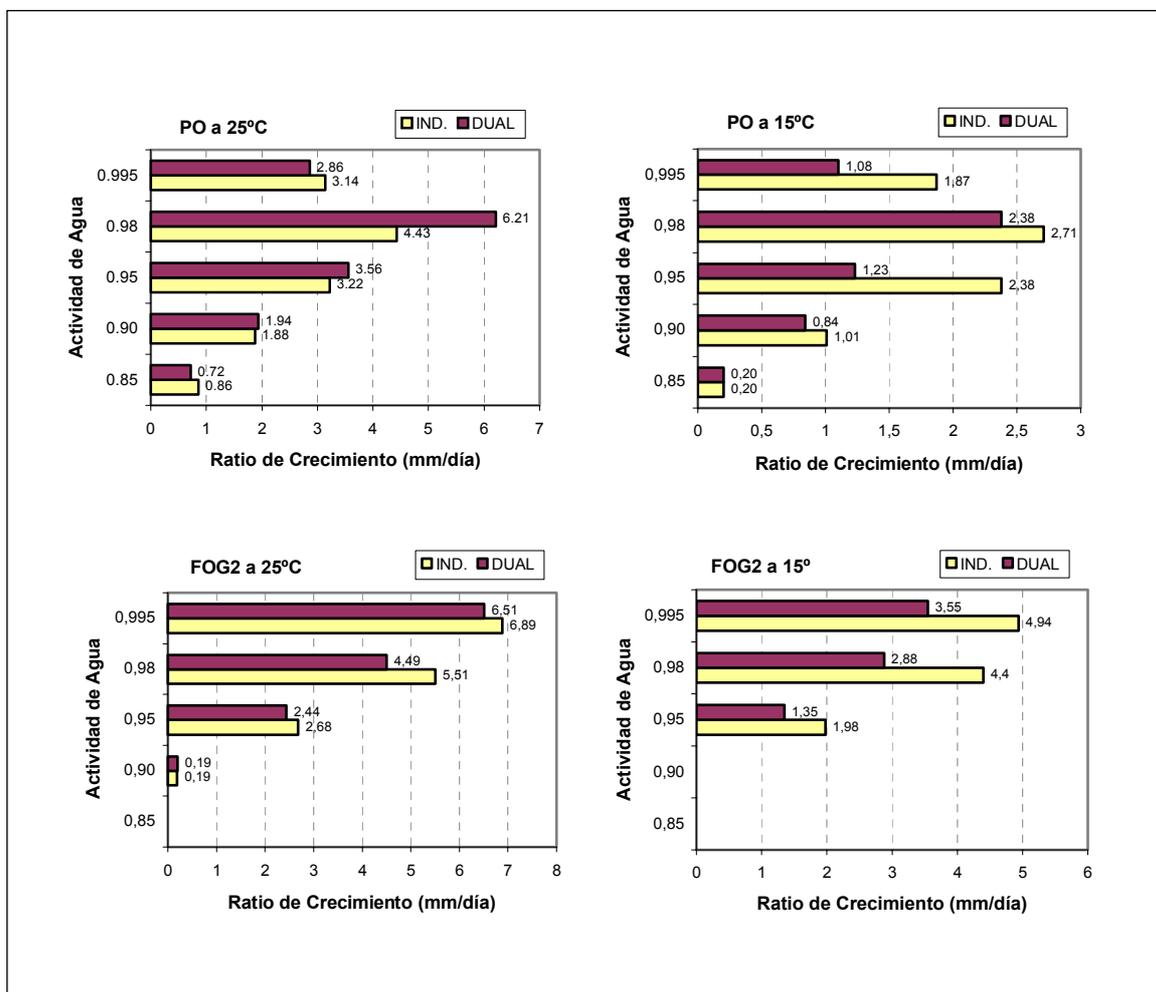


Figura 66: Comportamiento del crecimiento de las cepas PO y FOG2 en el estudio individual y dual a las a_w y T ensayadas.

Los resultados del análisis de la varianza reflejados en la Tabla 28, del efecto de la a_w , la T, la E y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$, $T \times E$) sobre el crecimiento medio de PO y FOG1 al ser enfrentadas, nos demuestran que los factores simples a_w y T, y las interacciones dobles $a_w \times T$, $a_w \times E$, y $T \times E$ tienen efecto significativo ($P < 0.05$) sobre el crecimiento medio de las cepas estudiadas.

Tabla 28: ANOVA del crecimiento dual PO-FOG2; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T), especie fúngica (E) y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$ y $T \times E$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-Valor
a_w	4	3134.56	78.65	0.0000*
T	1	642.693	16.13	0.0001*
E	1	124.651	3.13	0.0776
$a_w \times T$	4	114.897	2.88	0.0223*
$a_w \times E$	4	899.12	22.56	0.0000*
T x E	1	504.773	12.66	0.0004*

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor
* Significativo $P < 0.05$

El gráfico de intervalos LSD de comparación de medias para el factor E, representado en la Figura 67, nos confirma que no existen diferencias significativas entre el crecimiento promedios de las dos especies estudiadas; aunque pese a no ser significativo, su P-valor nos indica que está próximo de serlo.

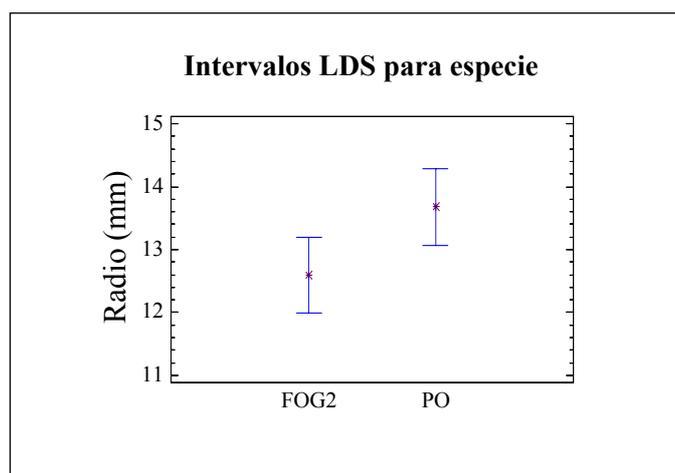


Figura 67: Intervalos LSD de comparación de medias para el factor E en PO-FOG2.

En la representación gráfica de la interacción formada por a_w x E de la Figura 68 se observa que las dos cepas no responden igual ($P < 0.05$) a los cambios de a_w . La respuesta de la cepa FOG2 es más marcada cuando el nivel de a_w es de 0.995. Sin embargo, la mayor respuesta para los niveles entre 0.85 y 0.95 la presenta la cepa PO.

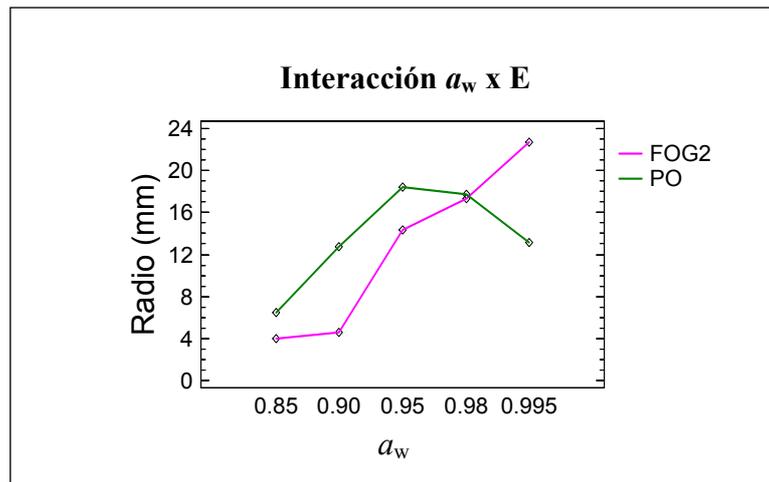


Figura 68: Gráfico de interacción entre los factores a_w x E en PO-FOG2.

Respecto a la interacción T x E del gráfico representado en la Figura 69 se establece que la respuesta de las dos cepas es distinta ($P < 0.05$), según el nivel de T ensayado, presentando PO un crecimiento más acentuado cuando la temperatura es de 25°C.

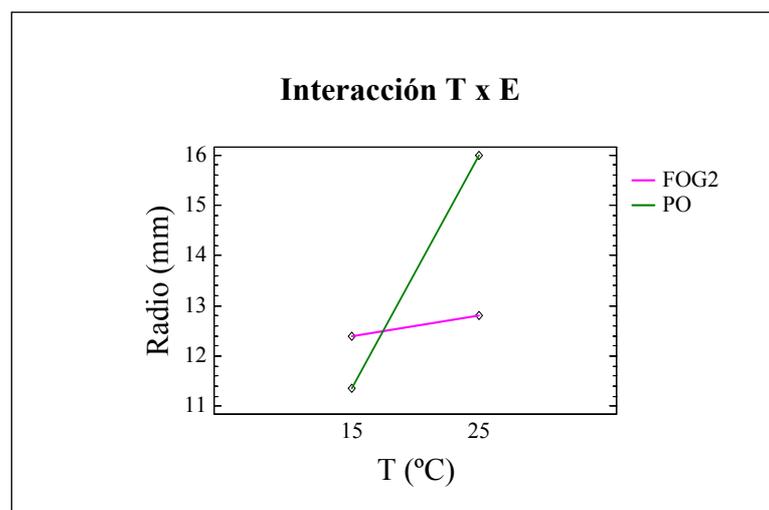


Figura 69: Gráfico de interacción entre los factores T x E en PO-FOG2.

A la vista de los resultados del estudio estadístico podemos predecir que, cuando las cepas PO y FOG2 interactúen en la naturaleza, se producirá un dominio de PO sobre FOG2 cuando la temperatura sea de 25°C y en la mayoría de las condiciones de a_w ensayadas, a excepción del nivel de 0.995 de a_w en el que se desarrollará mejor la cepa FOG2, al verse favorecido este género por niveles elevados de agua.

En las Figuras 70 y 71 se muestran una serie de fotografías correspondientes a las especies que componen esta interacción interespecífica, estando la colonia de PO situada a la izquierda y la de FOG2 a la derecha.

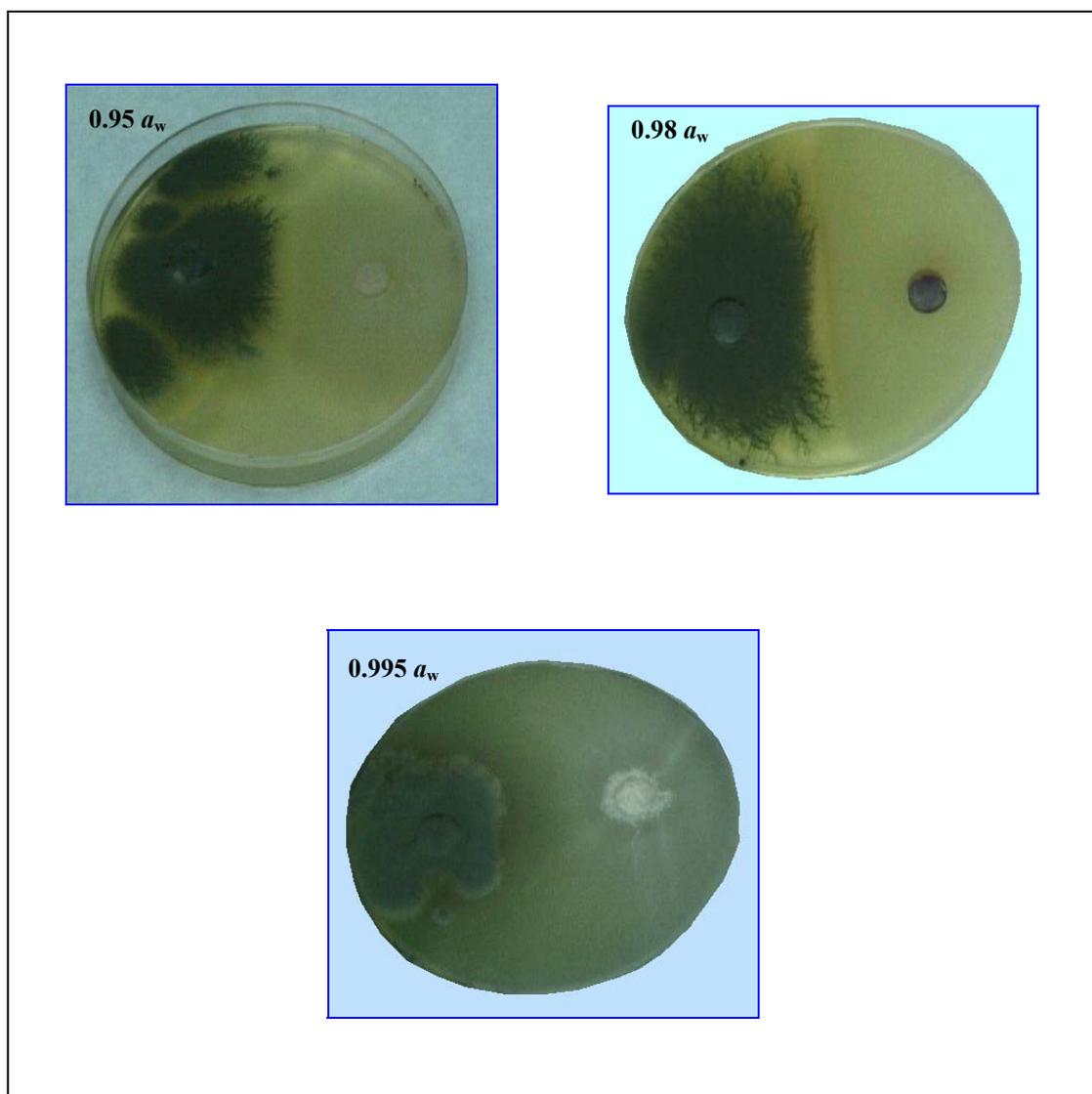


Figura 70: Crecimiento dual entre PO y FOG2 a 15°C.

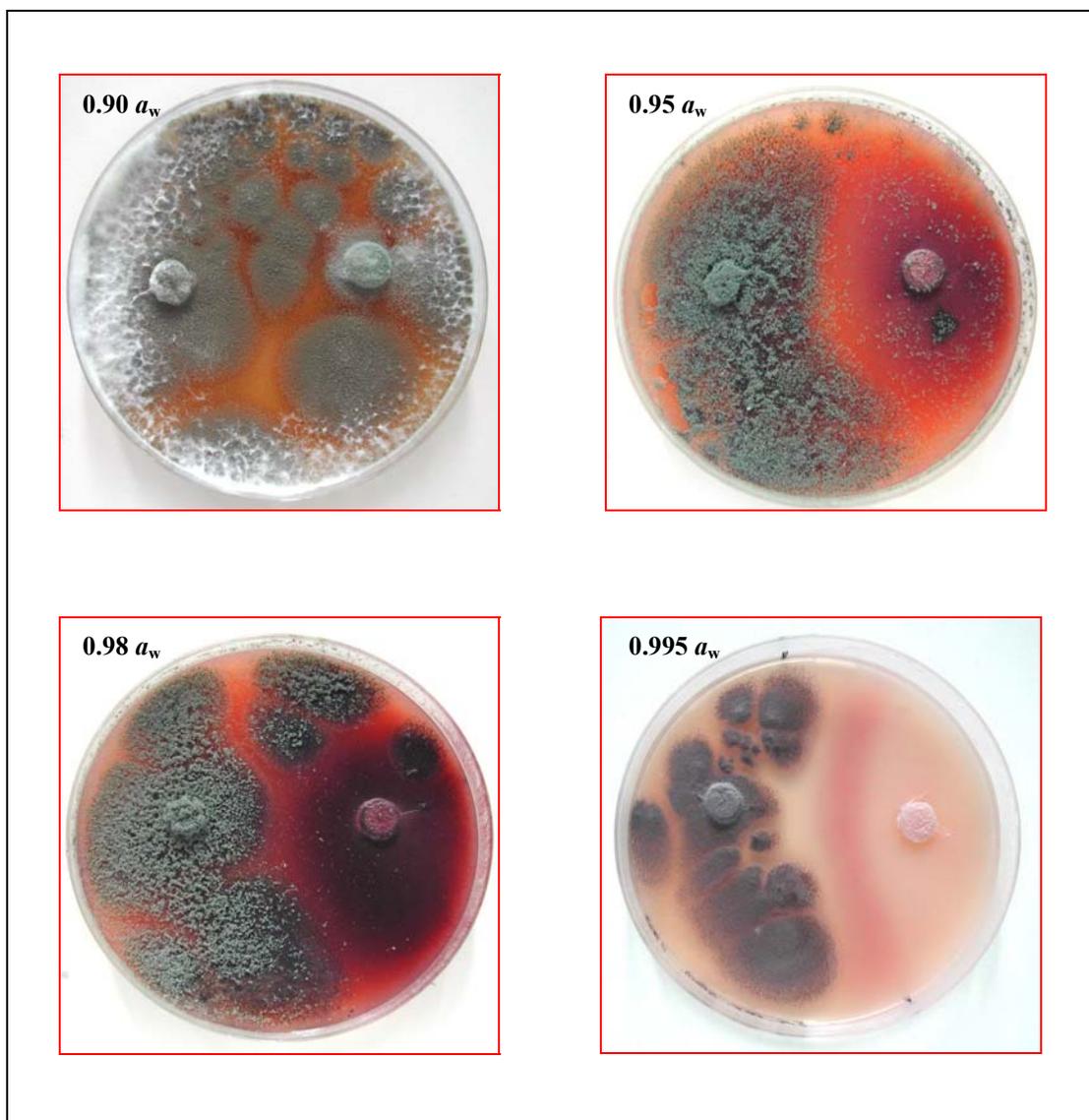


Figura 71: Crecimiento dual entre PO y FOG2 a 25°C.

5.2.5.- Interacción *Trichoderma harzianum* LBVB 1010 - *Rhizoctonia solani* CECT 2819

Los resultados del estudio del crecimiento dual entre TH y RS, en las condiciones de a_w y T ensayadas, se muestran en la Tabla 29 y se han representado gráficamente en la Figura 72. Estos valores se han obtenido a partir del ajuste de las rectas de regresión de los gráficos de las Figuras C-1 y C-2 del Anexo C.

Tabla 29: Ratios de crecimiento (mm/día) de TH y RS en crecimiento dual a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w).

		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	TH	0.00	0.00	4.75	10.41	17.71
	RS	0.00	0.00	0.00	3.65	8.20
15°C	TH	0.00	0.00	0.39	6.35	10.03
	RS	0.00	0.00	0.00	2.25	5.32

En la Figura 72 se representan gráficamente las ratios de crecimiento (mm/día) de cada cepa fúngica estudiada para cada condición de a_w y T. En ella se observa que ambas cepas, TH y RS, se desarrollan mejor cuando la disponibilidad de agua del medio es elevada, tanto en los ensayos a 15 como a 25°C.

La cepa TH crece, en las dos temperaturas, a las a_w de 0.95, 0.98 y 0.995, no mostrando desarrollo en los valores de menor a_w (0.85 y 0.90). Companys (1996) y Marín y col. (1998 a) también observaron que la especie *Trichoderma viride* mostraba crecimiento a las mismas a_w que la cepa TH estudiada en esta interacción interespecífica. La velocidad de crecimiento de TH es óptima para una a_w de 0.995, con valores de 17.71 mm/día a 25°C y 10.03 mm/día a 15°C, no obstante, al disminuir la a_w la ratio decrece, y para una a_w de 0.95, el valor que se obtiene es de 4.75 y 0.39 mm/día a 25 y 15°C respectivamente.

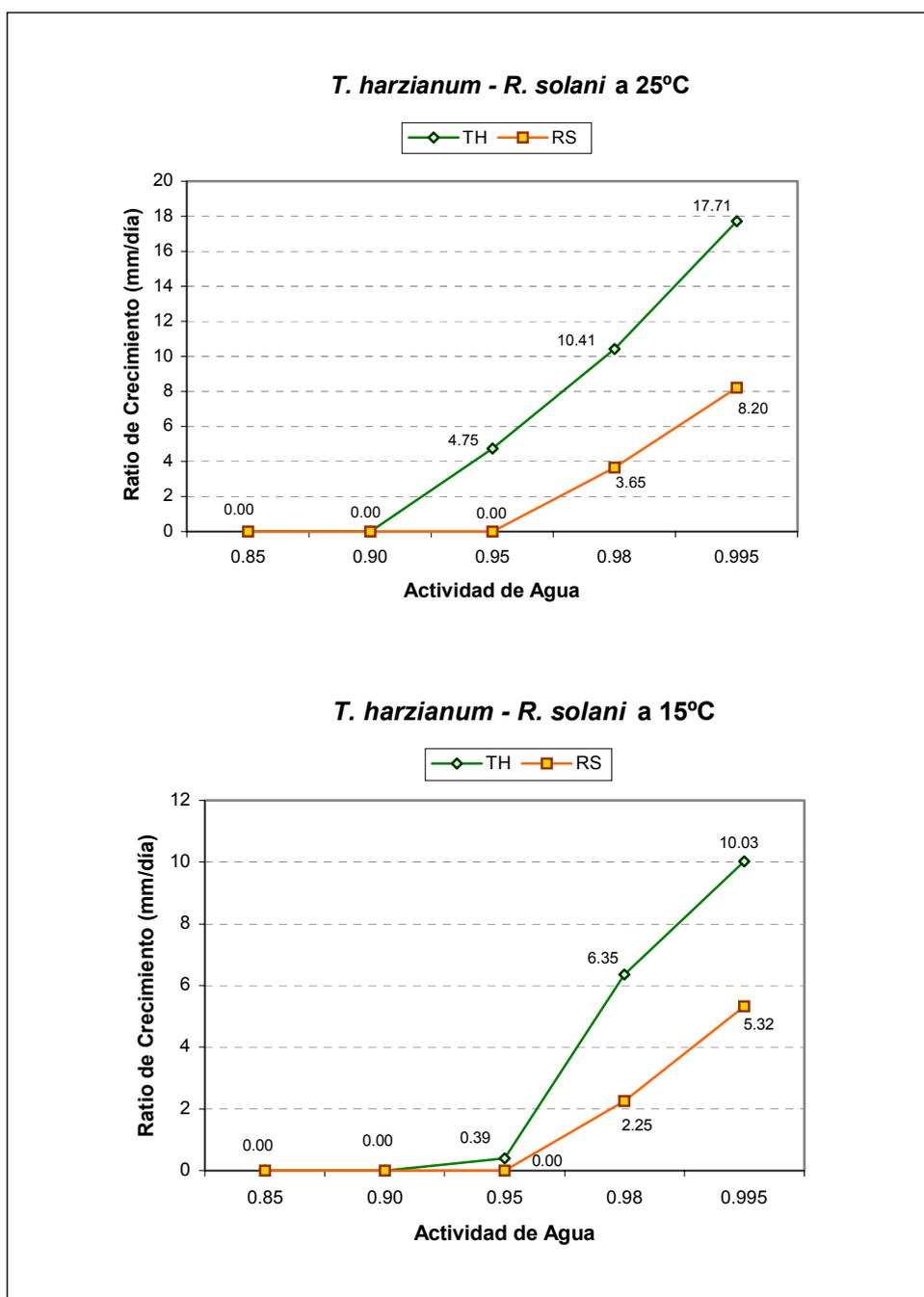


Figura 72: Influencia de la a_w sobre la velocidad de crecimiento en la interacción TH-RS en función de la temperatura.

Se observa una variación en las tasas de crecimiento con la temperatura, y esta variación fue también reseñada por Montealegre y Henríquez (1990), estableciendo que la ratio de crecimiento era mayor con el ascenso de temperatura; por ello TH se desarrolla mejor cuando la temperatura es de 25°C.

En cuanto a la cepa RS, independientemente de la temperatura ensayada, únicamente presenta crecimiento a las a_w de 0.98 y 0.995 (Figura 72). A la a_w de 0.995 se obtienen valores de crecimiento de 8.20 y de 5.32 mm/día a 25 y 15°C respectivamente. Mientras que a 0.98 de a_w , las ratios disminuyen y, los valores que se registran son de 3.65 mm/día a 25°C y de 2.25 mm/día a 15°C. Samson y col. (2000) reseñaron como valor de a_w mínima para RS el de 0.96.

En la cepa RS, al igual que en TH, hay un aumento de la ratio de crecimiento cuando cambia la temperatura de 15 a 25°C, siendo la temperatura de 25°C donde mejor crecerá RS.

Cuando analizamos la interacción formada por TH y RS (Figura 72) en las condiciones de a_w y T en las que las dos cepas crecen en común, es decir a las dos T y a_w de 0.995 y 0.98, se observa un claro predominio de TH sobre RS, al presentar siempre TH valores de crecimiento mucho más altos.

En la Figura 73 se puede observar el patrón de crecimiento mostrado por ambas cepas cuando se hacen crecer de forma individual y en común (dos a dos).

Destacar que TH presentó, en general, mayores ratios cuando creció de forma individual, independientemente de la temperatura, que cuando lo hizo en crecimiento dual, menos a 0.995 de a_w y a 25°C donde la ratio fue ligeramente mayor en el ensayo dual.

Respecto a RS, que sólo crece a las a_w de 0.98 y 0.995, vemos que el comportamiento mostrado fue distinto según la a_w de que se trate. A las dos T y para una a_w de 0.995, los valores alcanzados son un poco más altos en el estudio dual, sin embargo, para la a_w de 0.98, los mayores valores de crecimiento se obtienen, a 25°C en el estudio individual y, a 15°C en el ensayo dual.

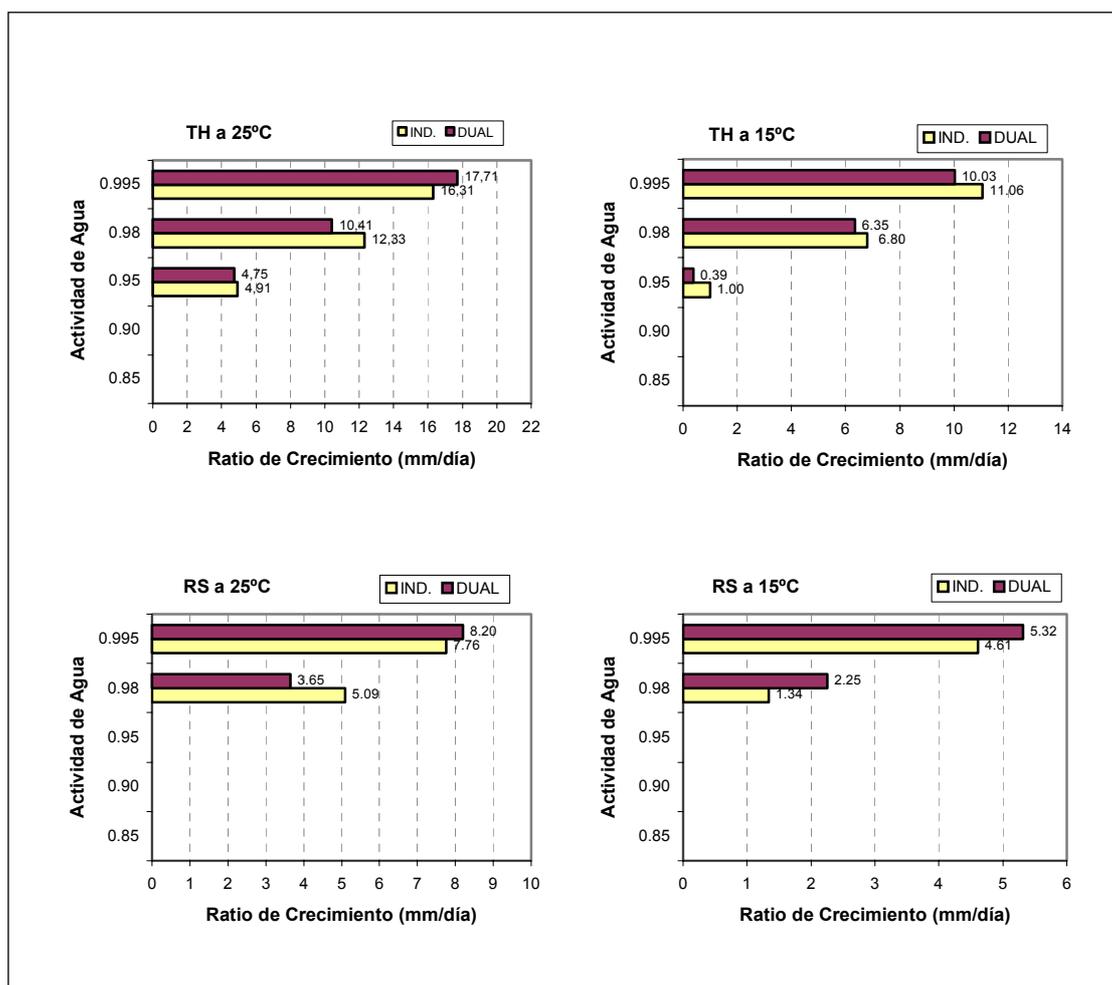


Figura 73: Comportamiento del crecimiento de las cepas TH y RS en el ensayo individual y dual a las a_w y T ensayadas.

El que ambas especies presenten mayores valores de crecimiento en las condiciones donde alcanzan el óptimo de crecimiento, es decir, en el ensayo dual a la temperatura de 25°C y a la a_w de 0.995, nos hace pensar que es la presencia de una de ellas la que influyen en el desarrollo de la otra y viceversa, debido probablemente a la competencia que se produce por el espacio que ocupan y por los nutrientes disponibles, por lo que en esas condiciones ambas cepas incrementan su tasa de crecimiento.

El análisis de la varianza, del efecto de la a_w , la T, la E y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$, $T \times E$) sobre el crecimiento medio de TH y RS cuando ambas especies son enfrentadas, es el que se muestra en la Tabla 30.

Tabla 30: ANOVA del crecimiento dual TH-RS; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T), especie fúngica (E) y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$ y $T \times E$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-Valor
a_w	4	8418,34	112,97	0.0000 *
T	1	3176,4	42,62	0.0000 *
E	1	4113,74	55,20	0.0000 *
$a_w \times T$	4	868,476	11,65	0.0000 *
$a_w \times E$	4	913,895	12,26	0.0000 *
T x E	1	906,359	12,16	0.0005 *

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor
* Significativo $P < 0.05$

Este análisis nos revela que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) tanto en los factores simples como en sus interacciones dobles sobre el crecimiento medio de los hongos.

En la Figura 74 se ha representado el gráfico de intervalos LSD de comparación de medias para el factor E. Dicho gráfico nos indica la existencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de crecimiento de las dos especies analizadas. Además, nos confirma que realmente hay un predominio claro de TH sobre RS, por lo que es altamente probable que este comportamiento se repita en condiciones medio ambientales.

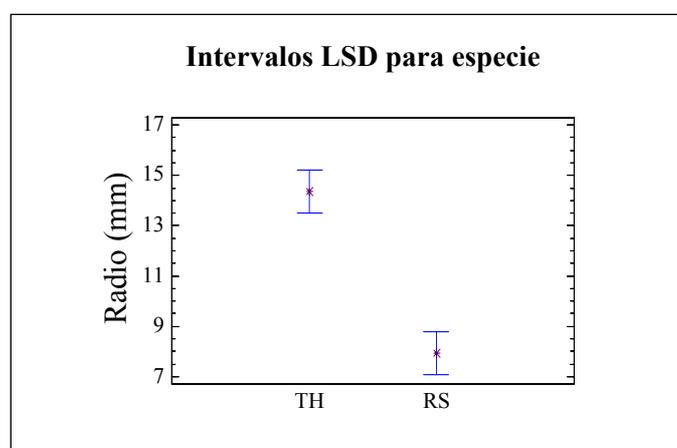


Figura 74: Intervalos LSD de comparación de medias para el factor E en TH-RS.

Las Figuras 75 y 76 nos muestran los gráficos de las interacciones a_w x E y T x E, respectivamente. En ellos se puede observar que cuando TH y RS se enfrentan muestran una respuesta muy distinta ($P < 0.05$) a los cambios de a_w y T, apreciándose claramente que TH presenta mayor respuesta a las variaciones de a_w y T que RS.

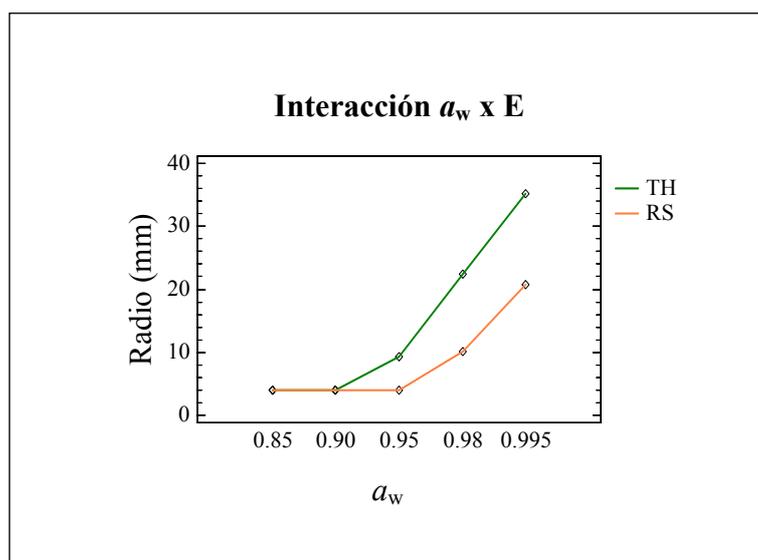


Figura 75: Gráfico de interacción entre los factores a_w x E en TH-RS.

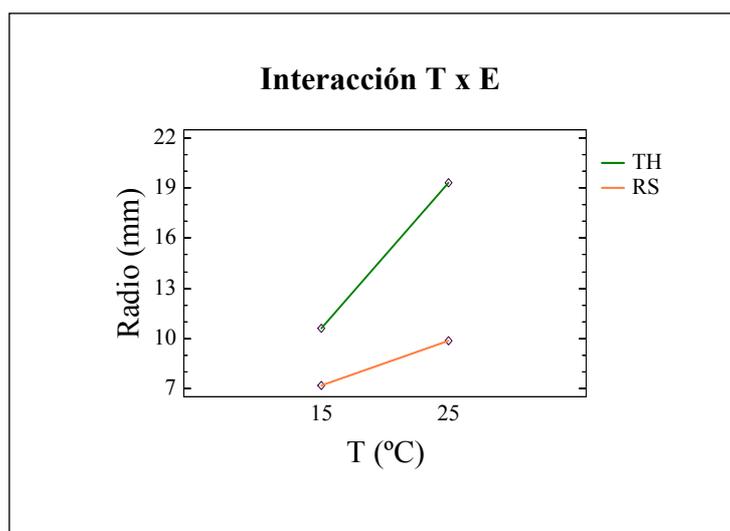


Figura 76: Gráfico de interacción entre los factores T x E en TH-RS.

De los resultados estadísticos podemos prever que, cuando las dos especies entren en competencia en su hábitat natural, se producirá una influencia clara de la cepa TH sobre la cepa RS, siempre que se den las mismas condiciones de a_w y T que se han ensayado en este trabajo.

Las Figuras 77 y 78 aportan una serie de imágenes del crecimiento mostrado por las especies que componen esta interacción interespecífica, siendo TH la colonia situada a la izquierda y RS la situada a la derecha.

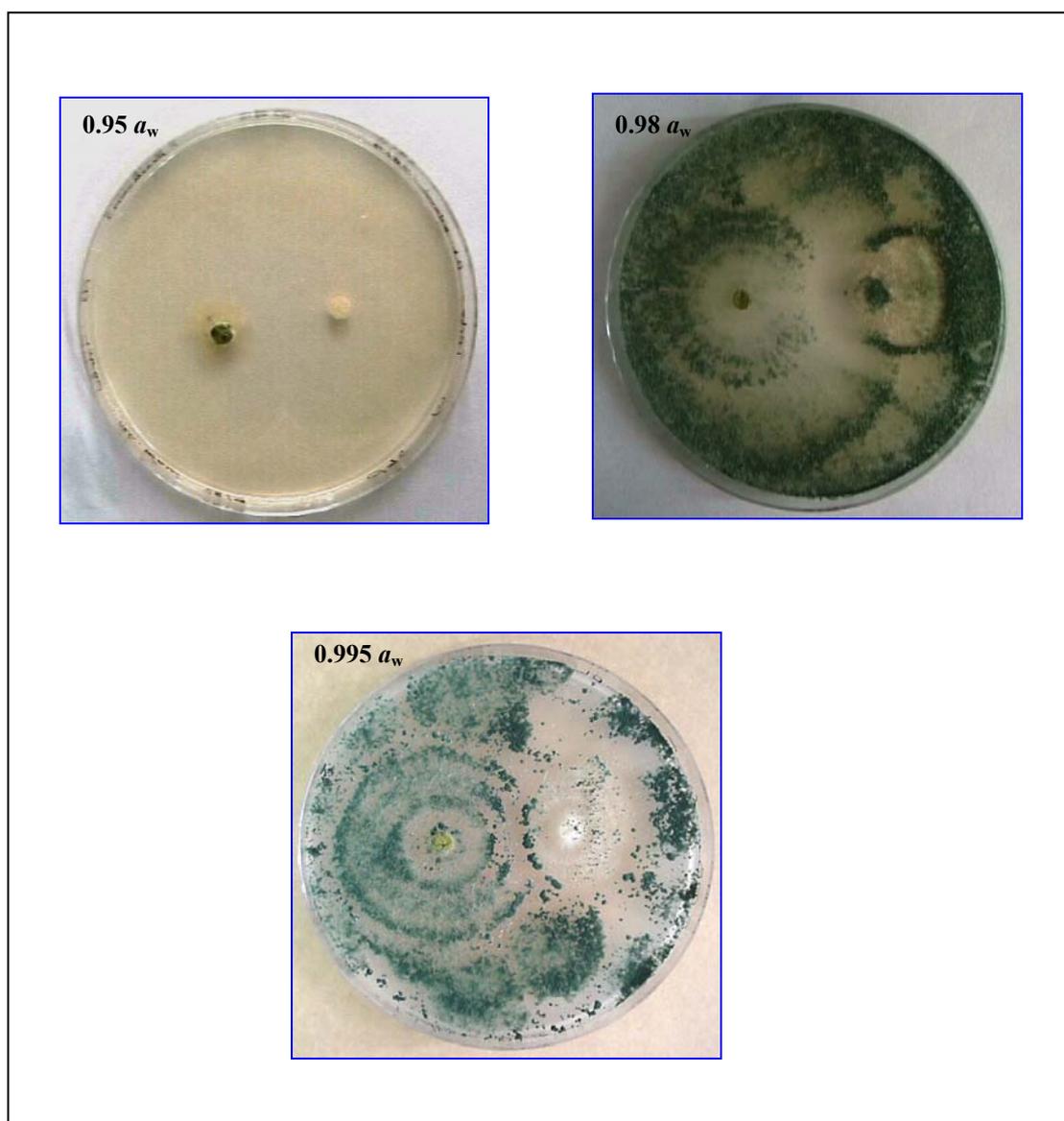


Figura 77: Crecimiento dual entre TH y RS a 15°C y a las a_w de 0.95, 0.98 y 0.995.

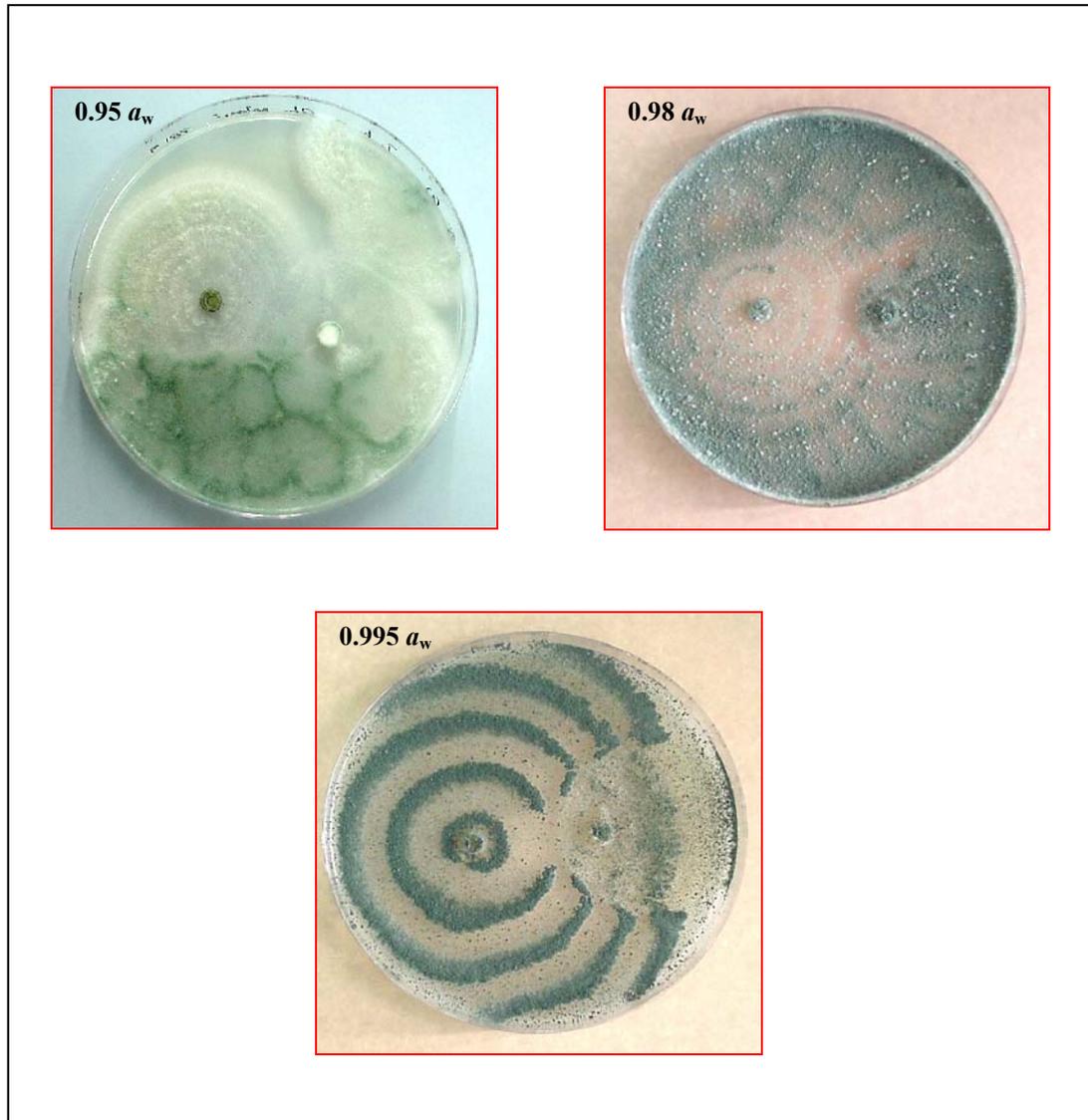


Figura 78: Crecimiento dual entre TH y RS a 25°C y a las a_w de 0.95, 0.98 y 0.995.

5.2.6.- Interacción *Trichoderma harzianum* LBVB 1010 – *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715

Los resultados del estudio del crecimiento entre TH y FOL1, bajo las diferentes condiciones ensayadas de a_w y T son los que se muestran en la Tabla 31 y gráficamente en la Figura 79, donde se representan las ratios de crecimiento (mm/día) de cada especie fúngica para cada a_w en función de la T. Los valores de las ratios de crecimiento se han obtenido a partir del ajuste de las rectas de regresión de las Figuras C-3 y C-4 del Anexo C.

Tabla 31: Ratios de crecimiento (mm/día) de TH y FOL1 en crecimiento dual a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w).

		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	TH	0.00	0.00	3.11	11.03	17.08
	FOL1	0.00	0.00	1.11	4.00	5.75
15°C	TH	0.00	0.00	0.75	4.45	8.20
	FOL1	0.00	0.00	0.63	1.21	1.91

En este estudio y a las dos temperaturas, tanto la cepa TH como FOL1, crecen a las mismas a_w , siendo éstas las comprendidas entre 0.95 y 0.995 de a_w . Por el contrario para las a_w de 0.85 y 0.90 ambas cepas no muestran crecimiento (Figura 79).

La cepa TH presenta en esta interacción interespecífica el mismo perfil de desarrollo que cuando se enfrentó con RS, al crecer a las mismas a_w en ambas temperaturas, y siendo el óptimo de crecimiento a la a_w de 0.995 (Figura 79). A la temperatura de 25°C alcanza ratios de crecimiento de 17.08 mm/día, mientras que a 15°C ese valor decrece a 8.20 mm/día. El valor más bajo se obtiene para una a_w de 0.95, con valores de 3.11 mm/día a 25°C y descendiendo a 0.75 mm/día a 15°C. En este estudio observamos, al igual que en la interacción anterior entre TH y RS, que hay una variación en las tasas de crecimiento de TH en función de la temperatura, a menor

temperatura menor es la ratio de crecimiento, siendo la temperatura más alta (25°C) la que favorece su desarrollo.

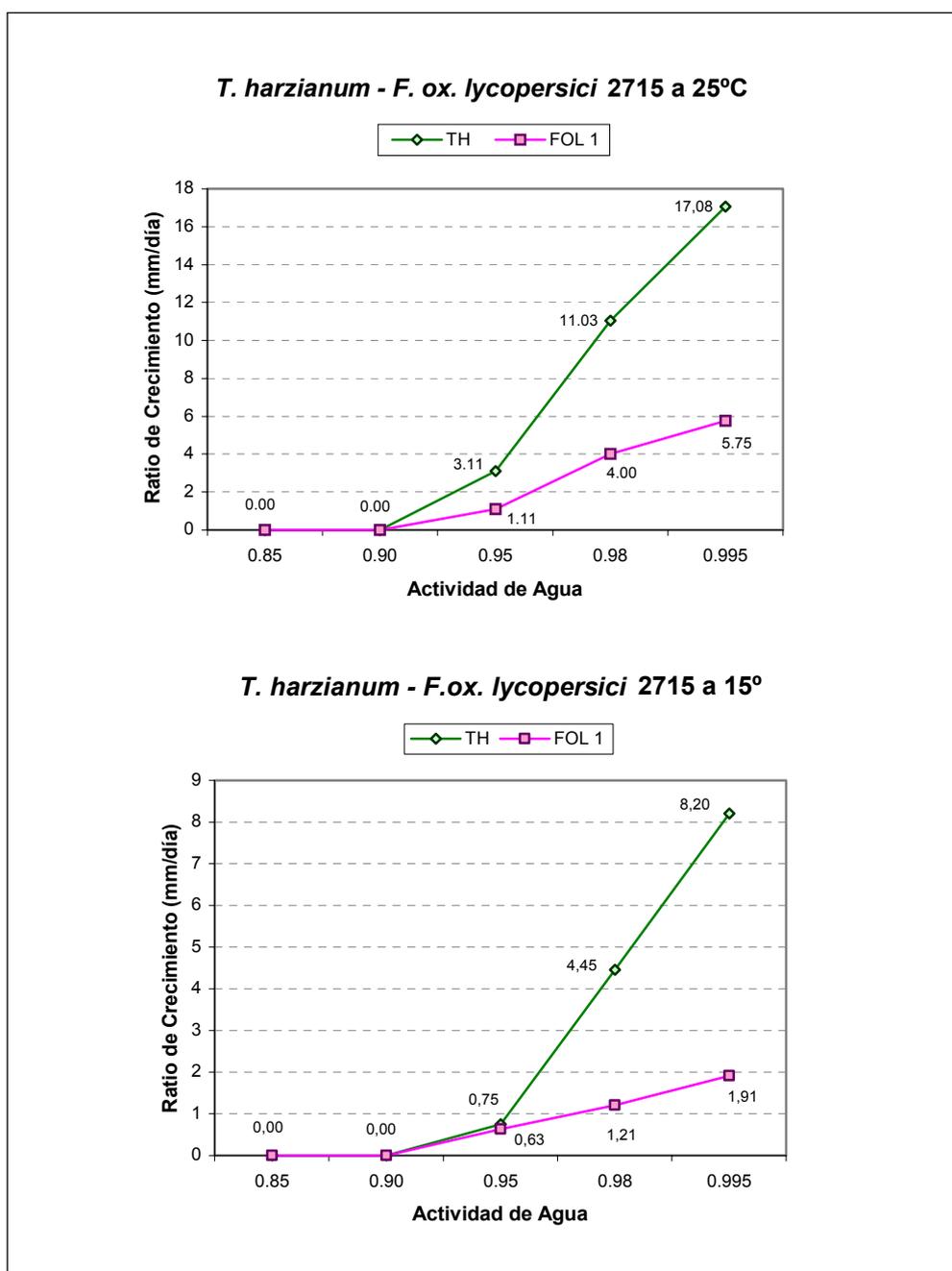


Figura 79: Influencia de la a_w sobre la velocidad de crecimiento en la interacción TH-FOL1 en función de la temperatura.

También en la cepa FOL1 (Figura 79) la velocidad de crecimiento es óptima a 0.995 de a_w , con valores de 5.75 y 1.91 mm/día a las temperaturas de 25 y 15°C respectivamente, coincidiendo con los valores observados por Lacey y Magan (1991). Para una a_w de 0.95, los valores obtenidos son bajos o muy bajos, de 1.11 mm/día a 25°C y de 0.63 mm/día a 15°C. Nuevamente se pone de manifiesto que es la temperatura la responsable de las variaciones en las ratios de crecimiento de FOL1, aumentando éstas a medida que cambia la temperatura de 15 a 25°C.

En la interacción interespecífica TH-FOL1 (Figura 79), y a diferencia de lo que sucedía en la interacción formada por PO y FOL1 estudiada en este trabajo en el apartado 5.2.1, se observa que la cepa FOL1 y a 25°C no presenta crecimiento a la a_w de 0.90, no obstante, en la interacción PO-FOL1, ésta sí que mostró crecimiento a esa a_w . La a_w mínima de crecimiento reseñada por Companys (1996), Frisvad y Samson (1991), Lacey y Magan (1991) y Marín y col. (1995, 1998 a) en otras especies de *Fusarium* estudiadas por ellos es de 0.90, resultado no obtenido por nosotros para la cepa FOL1 ensayada en la interacción TH-FOL1.

Este hecho puede deberse al rápido crecimiento mostrado por TH en todas las a_w en las que crece, observación que coincide con la de Marín y col. (1998 a) para *T. viride*, y como consecuencia de ello TH no deja que la cepa FOL1 se desarrolle de manera normal según su perfil de crecimiento. Por ello, FOL1 obtiene en la interacción TH-FOL1, valores de crecimiento bastante más bajos que cuando se enfrentó con la cepa PO.

En las experiencias llevadas a cabo a 25°C y en las a_w en las que ambas cepas crecen (0.95, 0.98 y 0.995), la cepa TH siempre presenta mayores ratios de crecimiento que FOL1, quedando de manifiesto el total predominio de TH sobre FOL1.

Cuando las experiencias se realizaron a 15°C, son las a_w de 0.98 y 0.995 en las que TH muestra ratios de crecimiento mucho más elevados que FOL1, mientras que para una a_w de 0.95 no se observan diferencias entre los valores de crecimiento de las dos cepas; por lo que creemos que a esa a_w las dos especies probablemente mostrarán una relación de antagonismo, es decir sin dominancia de una especie sobre la otra.

El comportamiento mostrado por TH y FOL1 en los ensayos de crecimiento individual y dual es el que se refleja en la Figura 80.

En la cepa TH, el intervalo de crecimiento fue siempre entre 0.95 y 0.995 de a_w , tanto en las experiencias a 15 como a 25°C. En general las ratios de crecimiento fueron mayores cuando se estudió de forma individual, excepto a 25°C y para la a_w de 0.995, donde los valores son ligeramente mayores en el ensayo dual.

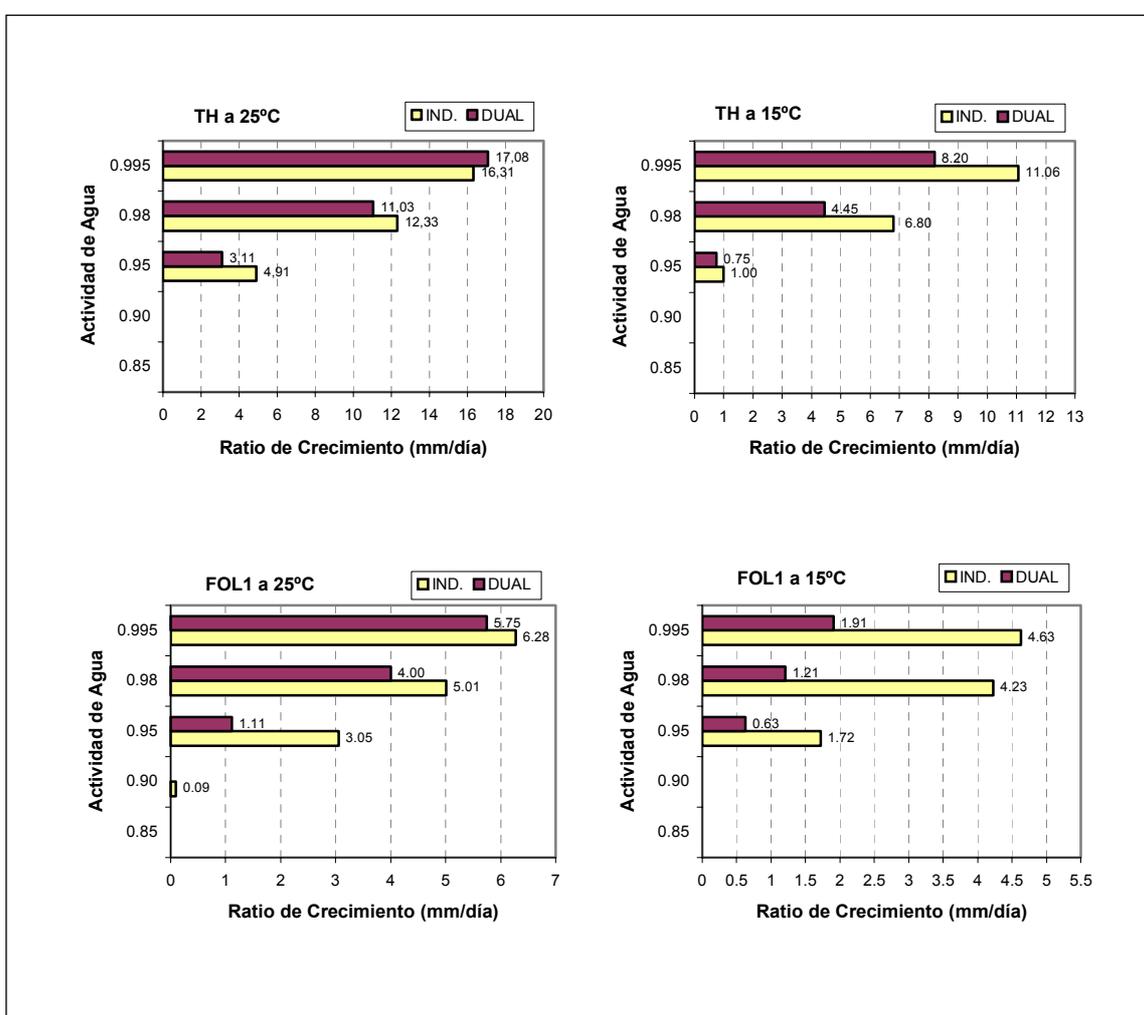


Figura 80: Comportamiento del crecimiento de las cepas TH y FOL1 en el ensayo individual y dual a las a_w y T ensayadas.

Respecto a la cepa FOL1, en todas las condiciones estudiadas de a_w y T, mostró mayores ratios de crecimiento en el ensayo individual que cuando lo hizo de forma dual. Además, a 25°C, en el ensayo individual creció a las a_w comprendidas entre 0.90 y 0.995, sin embargo en el ensayo dual y a esa misma temperatura, ese intervalo se redujo a las a_w de 0.95, 0.98 y 0.995.

La Tabla 32 muestra los resultados del análisis de la varianza del efecto de la a_w , la T, la E y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$, T x E) sobre el crecimiento medio de TH y FOL1 cuando ambas especies crecen en común. El análisis indica el efecto significativo ($P < 0.05$) de todos los factores analizados sobre el crecimiento medio de los hongos.

Tabla 32: ANOVA del crecimiento dual TH-FOL1; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T), especie fúngica (E) y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$ y T x E).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-Valor
a_w	4	4780.32	88.66	0.0000*
T	1	2673.31	49.58	0.0000*
E	1	3812.77	70.71	0.0000*
$a_w \times T$	4	1000.25	18.55	0.0000*
$a_w \times E$	4	1560.27	28.94	0.0000*
T x E	1	748.612	13.88	0.0002*

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor

* Significativo $P < 0.05$

Para completar el estudio estadístico se ha representado el gráfico de intervalos LSD de comparación de medias para el factor E (Figura 81) y los gráficos de las interacciones dobles $a_w \times E$ y T x E (Figura 82 y 83).

En el gráfico de intervalos LSD para el factor simple E (Figura 81) podemos observar que entre las medias de crecimiento de las dos especies analizadas existen diferencias significativas ($P < 0.05$), con un claro predominio de TH sobre FOL1.

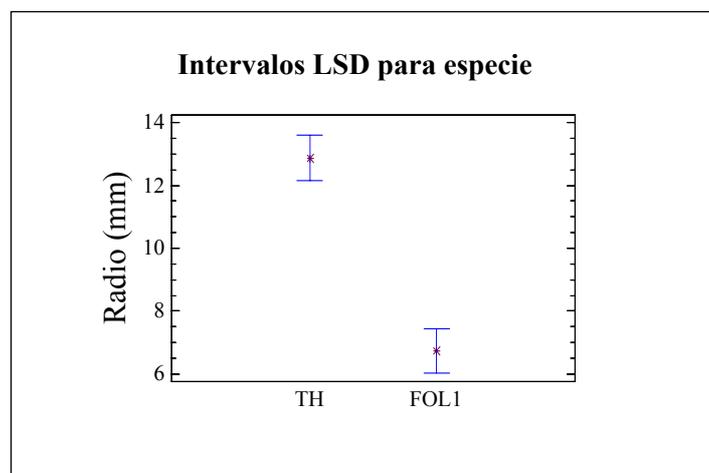


Figura 81: Intervalos LSD de comparación de medias para el factor E en TH-FOL1.

Los gráficos de las interacciones representados en las Figuras 82 y 83 nos demuestran que ambas especies responden de manera distinta ($P < 0.05$) a los cambios de a_w y T. Tanto en la interacción $a_w \times E$ como en la de $T \times E$, es la cepa TH la que muestra una respuesta más marcada a las variaciones de a_w y T.

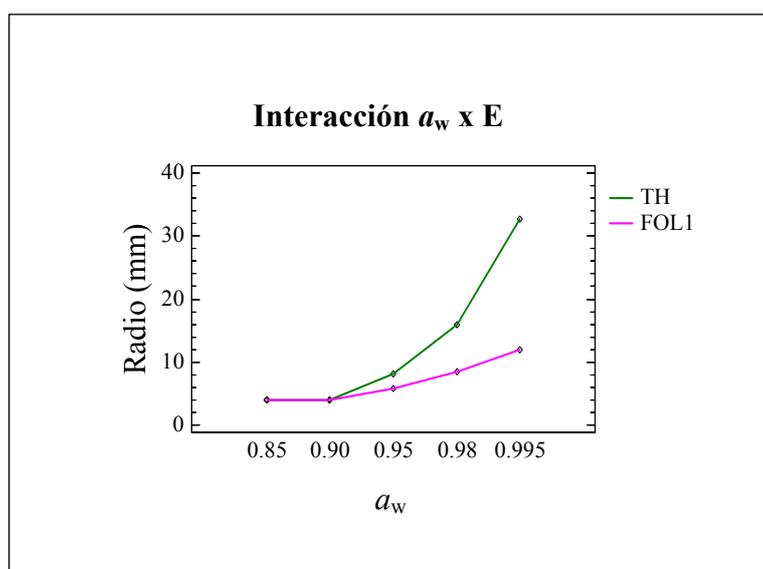


Figura 82: Gráfico de interacción de los factores $a_w \times E$ en TH-FOL1.

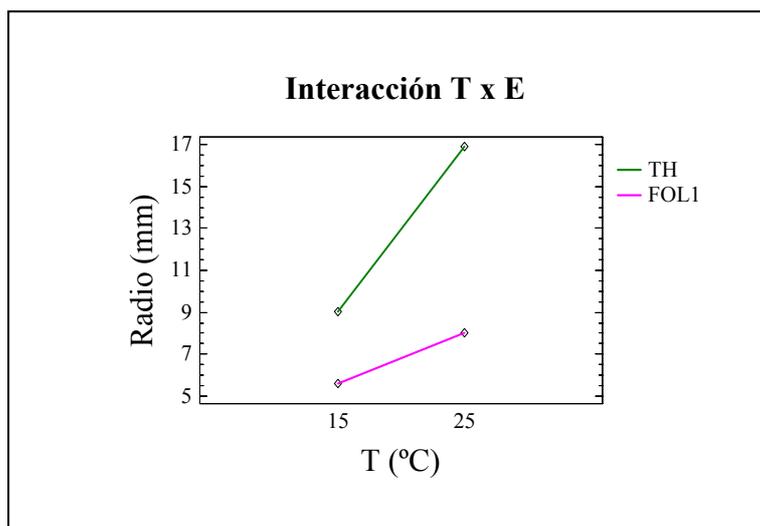


Figura 83: Gráfico de interacción de los factores T x E en TH-FOL1.

En principio, según estos resultados cuando las dos especies entren en competencia en la naturaleza y se den las condiciones aquí estudiadas, TH predominará sobre FOL1.

En las Figuras 84 y 85 se recogen una serie de imágenes correspondientes a las especies que componen esta interacción interespecífica, siendo siempre TH la colonia situada a la izquierda y FOL1 la situada a la derecha.

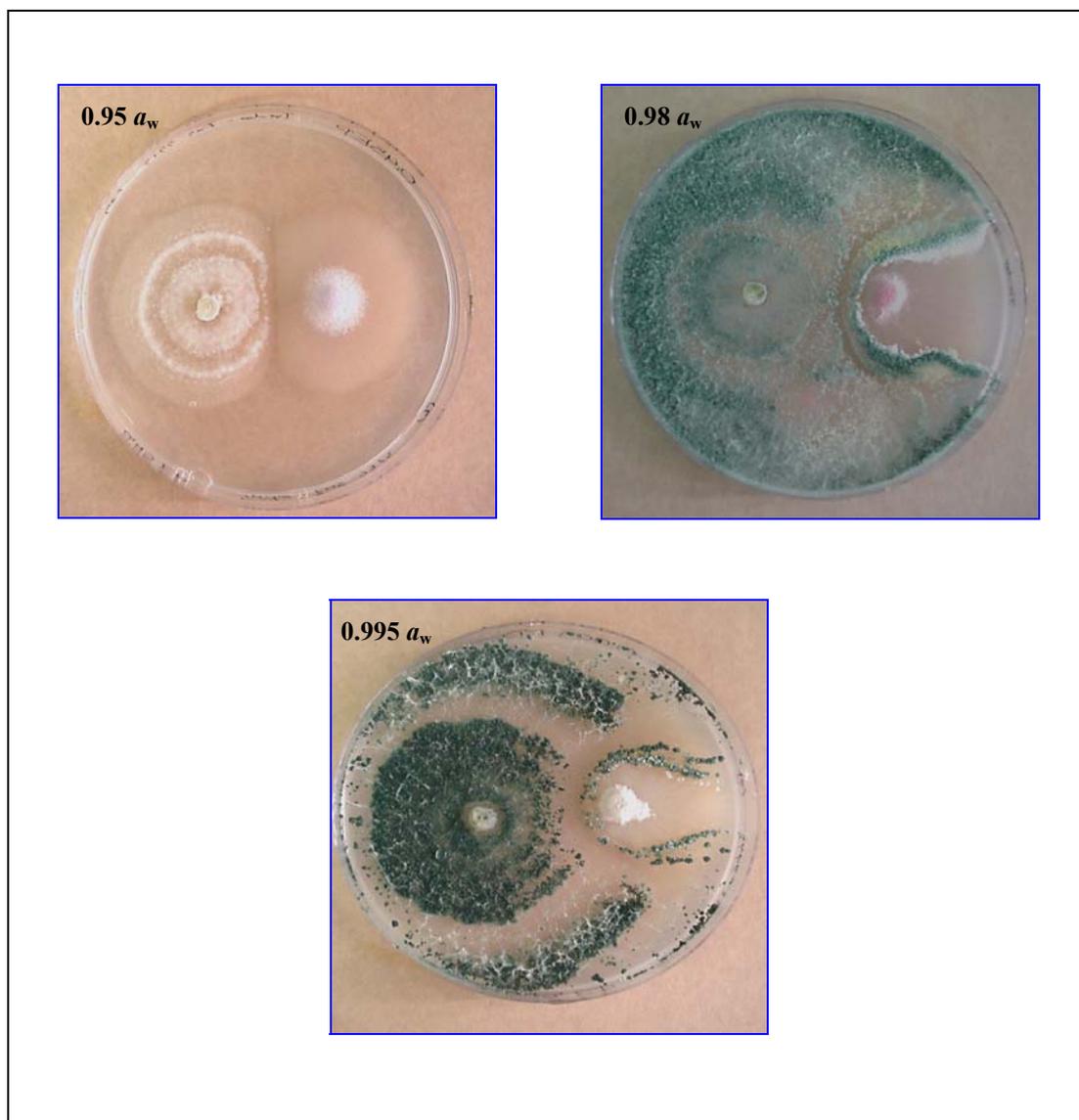


Figura 84: Crecimiento dual entre TH y FOL1 a 15°C y a las a_w de 0.95, 0.98 y 0.995.

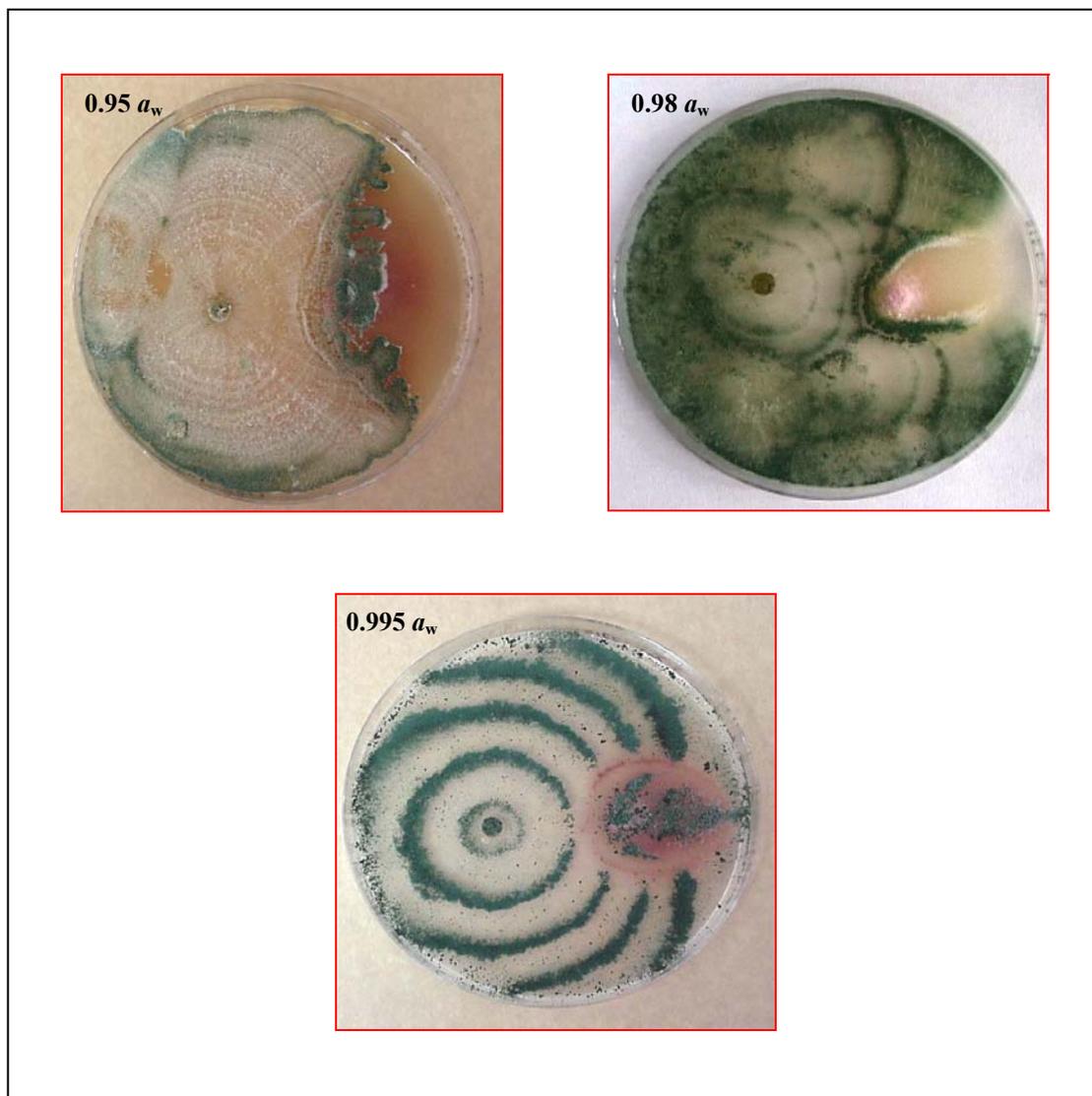


Figura 85: Crecimiento dual entre TH y FOL1 a 25°C y a las a_w de 0.95, 0.98 y 0.995.

5.2.7.- Interacción *Trichoderma harzianum* LBVB 1010 - *Verticillium dahliae* CECT 2694

Los resultados del crecimiento entre TH y VD cuando ambas cepas son enfrentadas, a las a_w y T ensayadas, se pueden observar en la Tabla 33 y gráficamente en la Figura 86, en la que se representan las ratios de crecimiento (mm/día) de cada una de ellas para las distintas a_w y T. Las ratios se han obtenido a partir del ajuste de las rectas de regresión de las Figuras C-5 y C-6 del Anexo C.

Tabla 33: Ratios de crecimiento (mm/día) de TH y VD en crecimiento dual a 15 y 25°C para los diferentes valores de actividad de agua (a_w).

		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	TH	0.00	0.00	3.66	11.92	18.19
	VD	0.00	0.00	0.00	0.60	1.75
15°C	TH	0.00	0.00	0.59	6.54	10.76
	VD	0.00	0.00	0.00	0.60	1.39

En la Figura 86 se aprecia que TH crece a las a_w más elevadas (0.95, 0.98 y 0.995), y esto sucede tanto a 15 como a 25°C, comportándose frente a VD del mismo modo en crecimiento dual que en ensayos anteriores al enfrentar TH con RS o FOL1.

La velocidad de crecimiento es óptima para una a_w de 0.995, y los valores que alcanza TH en la interacción aquí estudiada son de 18.19 mm/día a 25°C y de 10.76 mm/día a 15°C. Los valores más bajos de crecimiento se dan cuando la a_w decrece a 0.95, siendo éstos a 25°C de 3.66 mm/día y de 0.59 mm/día a 15°C.

En esta interacción se produce un incremento de las ratios de crecimiento al aumentar la temperatura, y estas variaciones en las tasas de crecimiento también fueron observadas por Montealegre y Henríquez (1990), como indicamos en las anteriores interacciones para la cepa TH.

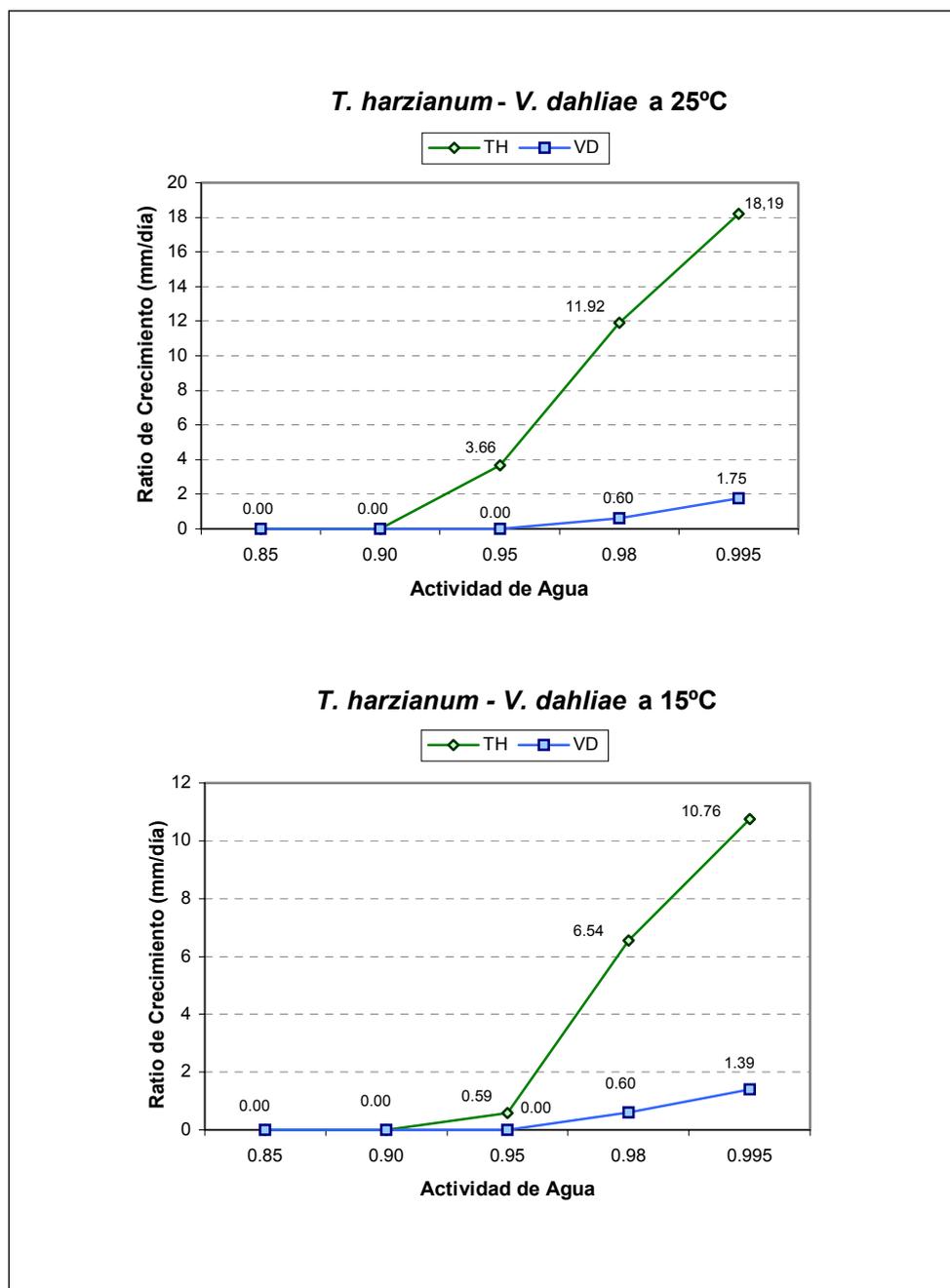


Figura 86: Influencia de la a_w sobre la velocidad de crecimiento en la interacción TH-VD en función de la temperatura.

En cuanto a la cepa VD, ésta crece a las a_w de 0.98 y 0.995 en ambas temperaturas (Figura 86). No obstante, Samson y col. (2000) reseñan el valor de 0.90 como valor de a_w mínimo de crecimiento para *Verticillium lecanii*. La velocidad de crecimiento es máxima para la a_w 0.995, siendo los valores a 25°C y 15°C de 1.75 y 1.39 mm/día, respectivamente. A la a_w de 0.98, el valor de crecimiento que se obtiene es el mismo (0.60 mm/día para las dos temperaturas).

Si comparamos ambas temperaturas, se aprecia que las ratios de crecimiento registradas por VD varían muy poco cuando la temperatura cambia de 15 a 25°C.

Al analizar la interacción formada entre TH y VD (Figura 86) cabe destacar que el crecimiento de VD se ve condicionado por el de TH. La cepa VD, como pudimos ver en el estudio individual, es una especie que presenta un crecimiento muy lento, al contrario de lo que le sucede a TH que se caracteriza por tener un crecimiento exuberante. Por ello en las condiciones en las que hay crecimiento de ambas cepas, es decir a las dos temperaturas y a las a_w de 0.98 y 0.995, siempre es TH la que predomina sobre VD, presentando TH ratios de crecimiento mucho más grandes.

En la Figura 87 se compara el comportamiento que han mostrado las dos cepas a las a_w y T estudiadas en los ensayos individual y dual.

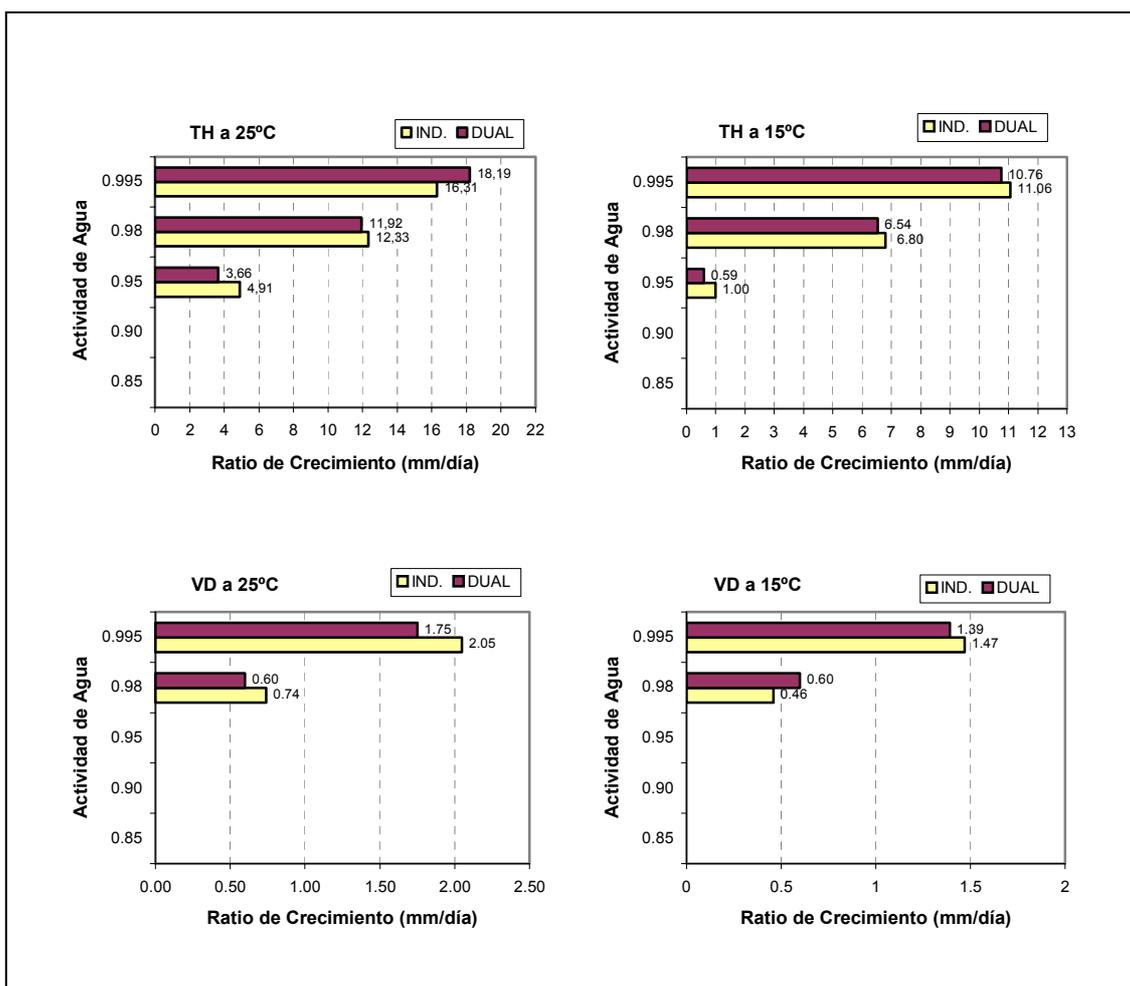


Figura 87: Comportamiento del crecimiento de las cepas TH y VD en el ensayo individual y dual a las a_w y T ensayadas.

El patrón de crecimiento de ambas cepas es, en general, similar en los dos estudios, individual y dual, aunque debido a la competitividad que surge entre las dos especies al tener que competir por el mismo espacio y los nutrientes, los valores obtenidos en el ensayo dual son generalmente más bajos que cuando crecen de forma individual. Resaltar que TH a 25°C y para la a_w de 0.995 muestra ratios de crecimiento mayores en el estudio dual que en el individual.

El análisis de la varianza representado en la Tabla 34, nos muestra los resultados del efecto de la a_w , la T, la E y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$ y $T \times E$) sobre el crecimiento medio de TH y VD cuando ambas crecen en común. Este análisis nos demuestra el efecto significativo ($P < 0.05$) que tanto los factores simples como sus interacciones dobles tienen sobre el crecimiento de las cepas.

Tabla 34: ANOVA del crecimiento dual TH-VD; significancia de los factores actividad de agua (a_w), temperatura (T), especie fúngica (E) y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$ y $T \times E$).

FACTOR	GL	CM	F-Ratio	P-Valor
a_w	4	3105.87	68.69	0.0000 *
T	1	603.325	13.34	0.0003 *
E	1	7677.02	169.80	0.0000 *
$a_w \times T$	4	125.884	2.78	0.0266 *
$a_w \times E$	4	2173.41	48.07	0.0000 *
$T \times E$	1	564.266	12.48	0.0005 *

GL: Grados de Libertad; CM: Cuadrado Medio; F-Ratio: F- Snedecor
 * Significativo $P < 0.01$; * Significativo $P < 0.05$

El gráfico de intervalos LSD (Figura 88) de comparación de medias para el factor simple E nos confirma que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de crecimiento de las dos especies analizadas. Como se puede observar el crecimiento promedio de TH predomina claramente sobre el obtenido por VD, por lo que posiblemente este comportamiento se volverá a repetir en la naturaleza.

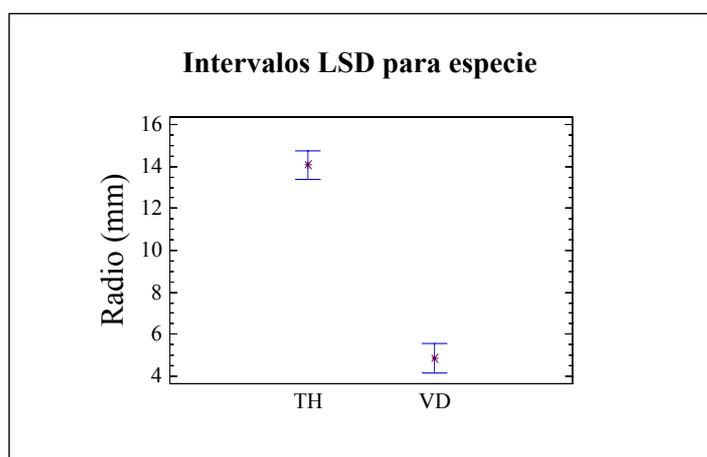


Figura 88: Intervalos LSD de comparación de medias para el factor E en TH-VD.

En los gráficos de interacciones a_w x E y T x E (Figuras 89 y 90) se observa que la respuesta a los cambios de a_w y de T es distinta para cada cepa ($P < 0.05$). La respuesta de TH, a las variaciones de a_w y T, es siempre más marcada que la que muestra VD. Además, destacar que VD apenas responde al aumento de T, mientras que TH si que lo hace, aumentando su crecimiento a medida que aumenta la temperatura.

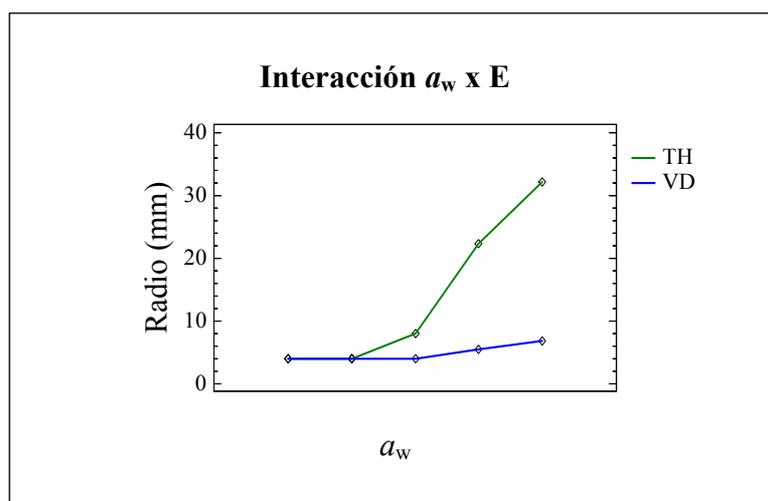


Figura 89: Gráfico de interacción entre los factores a_w x E en TH-VD.

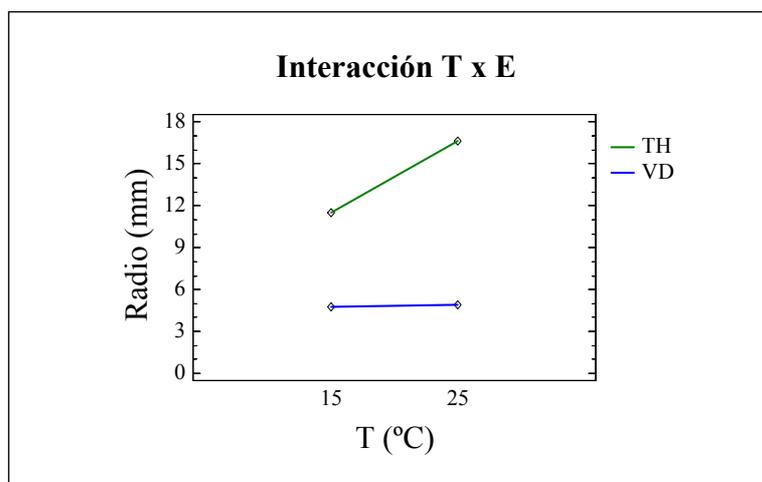


Figura 90: Gráfico de interacción entre los factores T x E en TH-VD.

A la vista de los resultados podemos decir que cuando ambas cepas se enfrenten en el medio ambiente entrarán en competencia y se producirá un claro predominio de TH sobre VD siempre que se den las condiciones ensayadas de a_w y T.

Las Figuras 91 y 92 muestran una serie de fotografías correspondientes a las especies que componen esta interacción interespecífica, siendo siempre TH la colonia situada a la izquierda y VD la situada a la derecha.

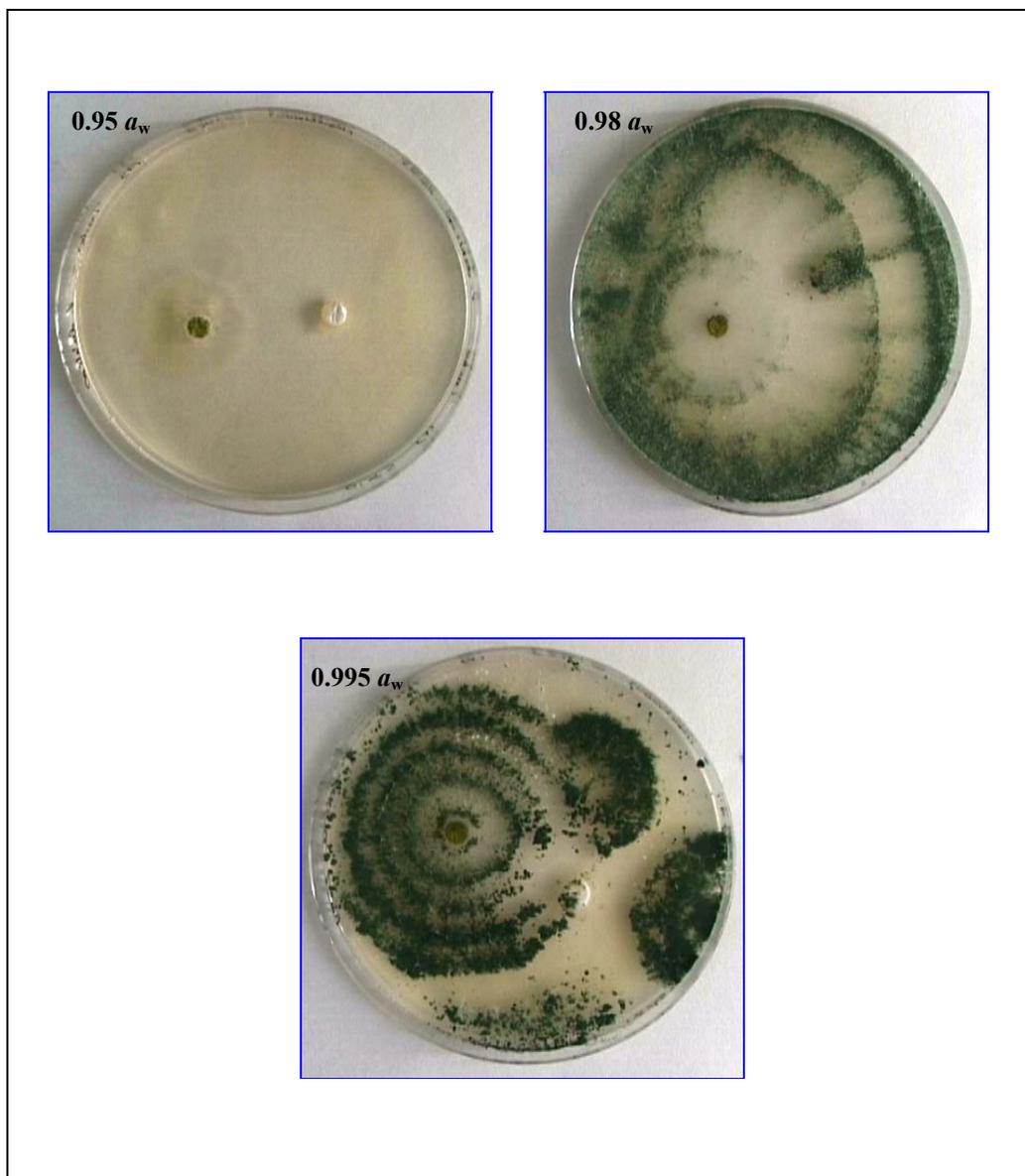


Figura 91: Crecimiento dual entre TH y VD a 15°C y a las a_w de 0.95, 0.98 y 0.995.

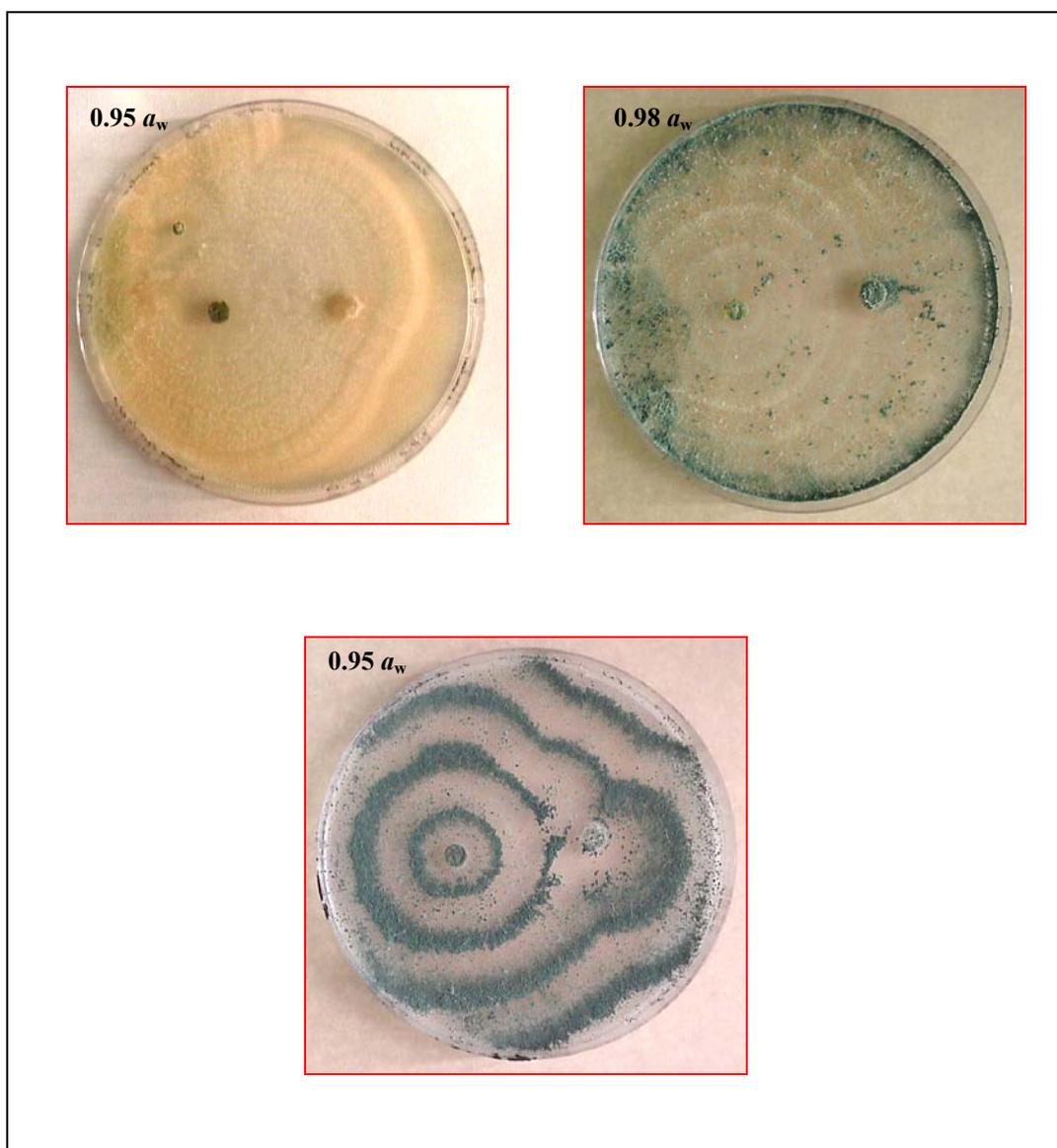


Figura 92: Crecimiento dual entre TH y VD a 25°C y a las a_w de 0.95, 0.98 y 0.995.

5.3.- Estudio del Tipo de Interacción e Índice de Dominancia en las interacciones fúngicas

Las interacciones pueden determinar qué especies dominarán en unas ciertas condiciones ambientales.

Dentro de este contexto, el Índice de Dominancia (I_D) tiene la finalidad de reflejar la habilidad de un hongo particular para competir y dominar sobre un conjunto de competidores en diferentes sustratos y condiciones de temperatura y disponibilidad de agua.

Los estudios “*in vitro*” del Índice de Dominancia entre especies fúngicas que atacan a las plantas, frutos, granos, etc., pueden ayudar a predecir el comportamiento de esos hongos cuando están sometidos a unas condiciones determinadas y, además, es importante para entender y prevenir el deterioro del grano almacenado (Magan y Lacey, 1984).

Para el estudio del Tipo de Interacción a cada hongo se le asigna una letra, dependiendo del tipo de relación que se establezca entre ellos, y a cada letra le corresponde un valor numérico (Tabla 6 del apartado 4.2.4.). Siguiendo dicho método, se calcula el Índice de Dominancia para cada combinación de especies a las distintas actividades de agua y temperatura.

5.3.1.- Interacción *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 - *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715

Los resultados del Tipo de Interacción que se obtienen cuando las cepas PO y FOL2 crecen en común, en las condiciones ensayadas de a_w y T, son los que se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35: Tipo de Interacción entre las cepas PO-FOL1 a las diferentes a_w y T.

Tipo de Interacción		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO / FOL1	D _{(PO)*}	E _(PO)	E _(PO)	B	C
15°C	PO / FOL1	-	E _{(PO)*}	B	B	B

(Especie): La especie entre paréntesis es la especie inhibidora.

- : No hay interacción. Ninguna de las dos especies ha crecido.

* : Se añade el signo a la interacción cuando sólo crece una de las dos especies

El crecimiento dual entre las cepas PO y FOL1, cuando las condiciones son de 25°C y la disponibilidad de agua es alta, origina interacciones de Tipo C para 0.995 de a_w , y de Tipo B para 0.98, antagonismo mutuo a distancia y al contacto, respectivamente, y sin predominio de una cepa sobre la otra (Figura 93). A partir de valores igual o menores que 0.95 de a_w , el Tipo de Interacción pasa de antagonismo a dominancia por contacto (Tipo D) a la a_w de 0.85, y a dominancia a distancia (Tipo E) para las a_w de 0.90 y 0.95. En ambos casos de dominancia (D y E), la especie PO, al ser más competitiva, consigue dominar en la interacción inhibiendo el desarrollo de la cepa FOL1, y posteriormente continúa creciendo a través de la colonia de FOL1 (Figura 94). Ahora bien, en la interacción del valor 0.85 de a_w (Tipo D), sólo la cepa dominante muestra crecimiento.

En los ensayos realizados a la temperatura de 15°C, el Tipo de Interacción que se origina entre PO y FOL1 es siempre de antagonismo mutuo por contacto (Tipo B) cuando los valores de a_w son entre 0.95 y 0.995, como se observa en la Figura 95; valores que se corresponden con las a_w en las que ambas cepas crecen en común.

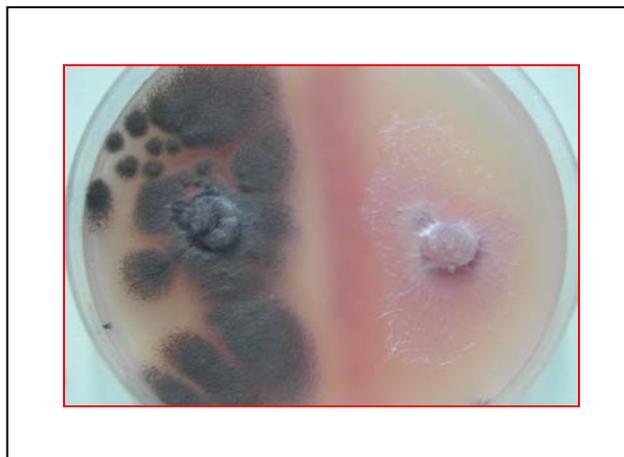


Figura 93: Interacción Tipo C entre PO-FOL1* a 25°C y 0.995 de a_w .



Figura 94: Interacción Tipo E entre PO-FOL1* a 25°C y 0.95 de a_w .



Figura 95: Interacción Tipo B entre PO-FOL1* a 15°C y 0.95 de a_w .

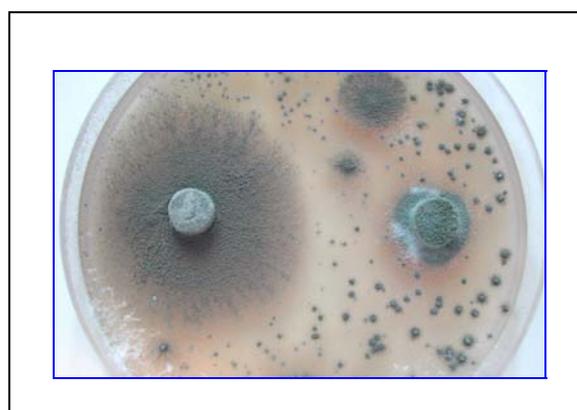


Figura 96: Interacción Tipo E entre PO-FOL1* a 15°C y 0.90 de a_w .

(* PO es la colonia situada a la izquierda de la imagen.

Para una a_w de 0.90, las dos especies establecen interacción Tipo E (Figura 96), inhibición a distancia, pero con desarrollo sólo de la especie inhibidora, nuevamente PO inhibe a FOL1. De todas las a_w ensayadas, únicamente, no se produce interacción entre las cepas en el caso de menor disponibilidad de agua (0.85 a_w), puesto que ninguna de las dos crece para valores tan bajos de a_w .

En los estudios realizados por Companys (1996) y Marín y col. (1998 a y b) sobre otras especies de *Penicillium* y *Fusarium*, también se observó que cuando la disponibilidad de agua no era muy alta se producía un dominio de las especies de *Penicillium* sobre las de *Fusarium*. No obstante, en sus experiencias las especies de *Fusarium* fueron más competitivas para valores de a_w elevados, mientras que en esas mismas condiciones las cepas PO y FOL1 estudiadas por nosotros muestran antagonismo mutuo.

En la Tabla 36 se muestran los valores numéricos del I_D obtenidos para las cepas PO y FOL1 según el Tipo de Interacción que establecen (Tabla 35) para cada combinación de a_w y T ensayadas.

Tabla 36: I_D de las cepas de la interacción PO-FOL1 a las diferentes a_w y T.

Índice de Dominancia (I_D)		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO / FOL1	4 / 0	5 / 0	5 / 0	2 / 2	3 / 3
15°C	PO / FOL1	0 / 0	5 / 0	2 / 2	2 / 2	2 / 2

En la Figura 97 se representan los gráficos del efecto de la a_w sobre la ratio de crecimiento y el I_D de las cepas PO y FOL1 enfrentadas, según la temperatura. Los valores para su representación son los que aparecen en la Tabla 36 y en la Tabla 21 del apartado 5.2.1

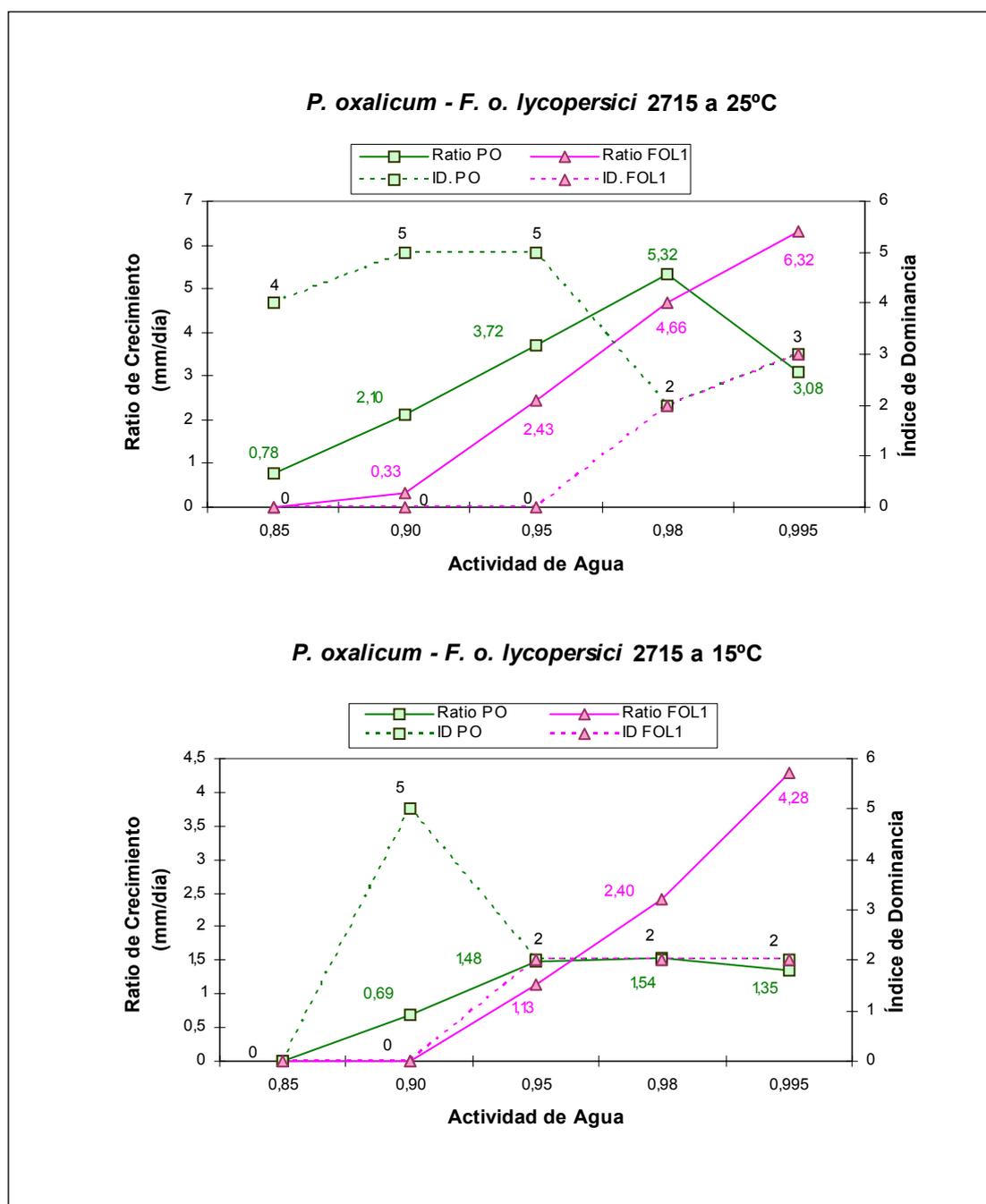


Figura 97: Relación entre la Ratio de Crecimiento y el I_D en la Interacción PO-FOL1 en función de la T.

Cuando la cepa PO se hace crecer a la temperatura de 25°C, no se aprecia paralelismo entre la ratio de crecimiento y el I_D . La ratio aumenta a medida que lo hace la a_w hasta llegar al valor de 0.98, donde alcanza el máximo crecimiento, disminuyendo después al valor de 0.995. Por el contrario el I_D evoluciona de manera inversa a la ratio

de crecimiento, es decir a mayor disponibilidad de agua menor es el valor numérico del I_D , y es máximo entre las a_w de 0.85 y 0.95, con valores de 4 a 0.85 de a_w , y de 5 a las a_w de 0.90 y 0.95. Para valores más altos de a_w , 0.98 y 0.995, el I_D desciende a 2 para ascender posteriormente al valor 3 para 0.995.

Cuando la temperatura es de 15°C, los valores de crecimiento de PO son bastante más bajos que a 25°C, y tampoco se observa paralelismo entre ratio de crecimiento e I_D . En el intervalo de a_w de 0.90 a 0.995, la pauta que sigue la ratio de crecimiento también es contraria a la del I_D , y el valor máximo de I_D (valor 5) se consigue en una a_w (0.90) donde el crecimiento es bajo. Para valores superiores a 0.95 de a_w , el I_D desciende al valor 2 y se mantiene constante a medida que se incrementa la a_w , por el contrario la ratio va aumentando hasta alcanzar el óptimo de crecimiento (0.98), y posteriormente desciende hasta llegar a la a_w de 0.995.

En la cepa FOL1, se observa que a 25°C, el I_D es nulo en el intervalo de 0.85 a 0.95, aunque aumente la a_w y la ratio de crecimiento (Figura 97). Este hecho se debe, en primer lugar, a que a 0.85 de a_w esta cepa no mostró crecimiento y, en segundo lugar, a que su desarrollo se vio inhibido por PO en las demás a_w . Cuando las a_w son altas, el I_D evoluciona del valor 2 a 0.98 de a_w al 3 para una a_w de 0.995, mientras que la ratio sigue incrementándose con la mayor disponibilidad de agua del medio.

La pauta que sigue la ratio y el I_D de FOL1 a la temperatura de 15°C es semejante a la que exhibió a 25°C, si bien los valores de crecimiento son menores cuando la temperatura desciende de 25 a 15°C. El I_D y la ratio son nulos para valores de 0.85 y 0.90 de a_w al no crecer FOL1 en esas a_w . En las restantes a_w , el I_D pasa a ser igual a 2, independientemente del ascenso de la a_w , entre tanto los valores de crecimiento continúan aumentando al subir la a_w .

En la interacción entre PO y FOL1 (Figura 97) se observa que la a_w tiene una clara influencia en la ratio de crecimiento de la cepa FOL1, esto era de esperar al ser un género al que le favorecen las a_w altas. Por el contrario, el I_D no se ve afectado por los cambios de a_w , permaneciendo prácticamente invariable aunque la disponibilidad de agua sea mayor. En general, la evolución mostrada por FOL1 ha sido muy similar tanto a 15 como a 25°C, y mientras el crecimiento se ve influenciado por el descenso de la

temperatura, no ocurre lo mismo con el I_D , que se conserva con valores muy próximos para las dos temperaturas.

Además, también se pone de manifiesto que no siempre las mejores condiciones para el crecimiento de las especies son las que permiten obtener buenos resultados de I_D , es decir mayor competitividad. Este comportamiento divergente entre la velocidad de crecimiento y el I_D es el que presenta la cepa PO, y es el que le va a permitir controlar y dominar a la cepa FOL1 en la interacción estudiada.

Estos resultados coinciden con los que observaron Companys (1996) y Hill (1979) en las especies de *Penicillium* con las que trabajaron, las cuales predominaron en las condiciones próximas al límite de a_w , más que en las condiciones óptimas para su desarrollo. Además, Magan y Lacey (1984) comparando el valor del I_D y las ratios de crecimiento entre hongos de campo y de almacén observaron que la competitividad no estaba relacionada con el crecimiento, como en el caso de *P. brevicompactum*, que aunque obtiene una de las ratios de crecimiento más bajas es un hongo capaz de dominar inhibiendo el crecimiento de sus competidores.

A la vista de los resultados podemos decir que PO es un hongo que posee una mayor habilidad para competir y dominar a FOL1 cuando la temperatura es de 25°C y las condiciones de a_w no superen el valor de 0.95.

Asimismo, el estudio “*in vitro*” entre PO y FOL1 corrobora el comportamiento antagonista de la especie *Penicillium oxalicum*, referenciado por otros autores (Agrios, 1999; Alfonso y col., 1992; Callan y col., 1996; Huang y Kuhlman, 1991; Ikotun, 1984; Ownley y Benson, 1987; Pandey y col., 1993; Pérez y col., 1982; Windels y Kommedahl, 1978, 1982), frente a distintos patógenos de plantas.

Igualmente, contribuye a los estudios que demuestran que *Penicillium oxalicum* es capaz de cumplir eficazmente como agente de biocontrol frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, causante de la fusariosis del tomate (De Cal y col., 1995, 1997 a y b, 1999, 2000, 2001; García Lepe y col., 1998; Larena y col., 2002; Pascual y col., 2000).

Este estudio, también, aporta información útil sobre algunos de los requerimientos ambientales de *Penicillium oxalicum*; tan necesarios para comprender el comportamiento de los hongos, así como para mejorar la eficacia de los agentes de biocontrol.

5.3.2.- Interacción *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 - *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2866

Los resultados obtenidos del Tipo de Interacción que establecen las cepas PO y FOL2, en todas las condiciones ensayadas de a_w y T, son los que se reflejan en la Tabla 37. Nótese que dichos resultados son bastante semejantes a los que se consiguieron en la interacción anterior, al enfrentar la cepa PO frente a la cepa FOL1.

Tabla 37: Tipo de Interacción entre las cepas PO-FOL2 a las diferentes a_w y T.

Tipo de Interacción		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO / FOL2	D _{(PO)*}	E _(PO)	E _(PO)	B	B
15°C	PO / FOL2	-	E _{(PO)*}	B	B	B

(Especie): La especie entre paréntesis es la especie inhibidora.
 - : No hay interacción. Ninguna de las dos especies ha crecido.
 * : El signo se añade cuando sólo crece una de las dos especies.

En las experiencias realizadas a la temperatura de 25°C y cuando la disponibilidad de agua es alta, a las a_w de 0.98 y 0.995, ambas cepas presentan un antagonismo mutuo por contacto (Tipo B), sin predominio de una sobre la otra (Figura 98). Sin embargo, para valores igual o menores que 0.95 de a_w , las dos cepas empiezan a competir, produciéndose un dominio claro de la cepa PO sobre FOL2, con inhibición a distancia a las a_w de 0.90 y 0.95 (Tipo E) e inhibición por contacto (Tipo D) a la a_w de 0.85; si bien a 0.85 de a_w únicamente crece la especie que domina en esta interacción interespecífica. En ambos casos de dominancia, la especie inhibidora, en nuestro caso la cepa PO, siempre continúa creciendo a través de la especie inhibida, la cepa FOL2 (Figura 99).



Figura 98: Interacción Tipo B entre PO-FOL2* a 25°C y 0.98 de a_w .

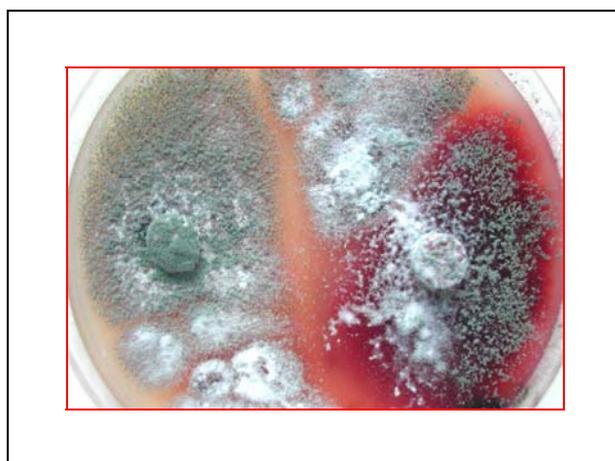


Figura 99: Interacción Tipo E entre PO-FOL2* a 25°C y 0.95 de a_w .

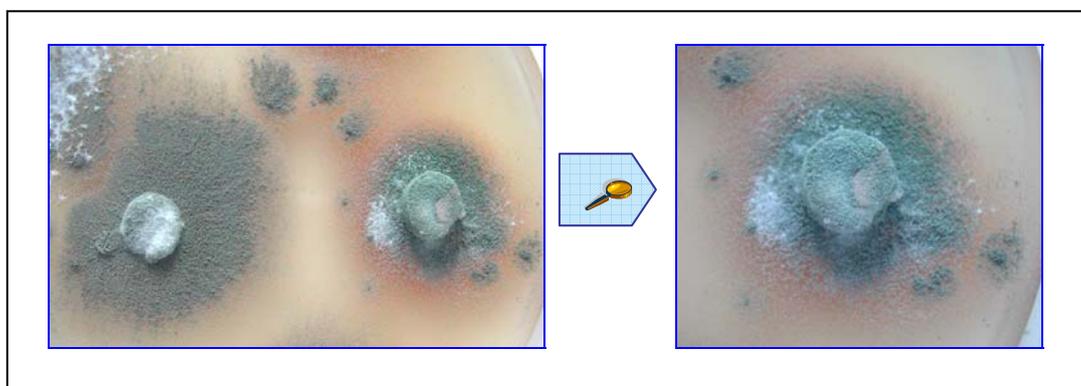


Figura 100: Interacción Tipo E entre PO-FOL2* a 15°C y 0.90 de a_w .

(*) PO es la colonia situada a la izquierda de la imagen.

Al disminuir la temperatura a 15°C y en las a_w en las que ambas cepas crecen en común, siendo éstas las comprendidas entre 0.95 y 0.995, se origina siempre un antagonismo mutuo por contacto. A esta temperatura y para una a_w de 0.90, la interacción que se establece entre ambas especies es de Tipo E (Figura 100), con inhibición a distancia de la cepa PO sobre FOL2, y con desarrollo sólo de la especie inhibidora. Cuando la a_w desciende al valor de 0.85 no hay interacción, puesto que ninguna de las dos cepas crece en esas condiciones.

Del mismo modo que en la interacción entre PO y FOL1, diversos autores observaron, en otras especies de *Penicillium* y *Fusarium*, que para las a_w bajas, eran las especies de *Penicillium* las que dominaban sobre las de *Fusarium*.

La Tabla 38 nos muestra los valores numéricos obtenidos del I_D de las cepas PO y FOL2, de acuerdo al Tipo de Interacción que establecen (Tabla 37) en cada combinación de a_w y T estudiadas.

Tabla 38: I_D de las cepas de la interacción PO-FOL2 a las diferentes a_w y T.

Índice de Dominancia (I_D)		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO / FOL2	4 / 0	5 / 0	5 / 0	2 / 2	2 / 2
15°C	PO / FOL2	0 / 0	5 / 0	2 / 2	2 / 2	2 / 2

Y en los gráficos de la Figura 101 se representa, comparativamente, el efecto de la a_w sobre la ratio de crecimiento y el I_D de las cepas PO y FOL2 enfrentadas, según la temperatura. Los valores utilizados para su representación son los que se muestran en la Tabla 38 y en la Tabla 23 del apartado 5.2.2.

La ratio de crecimiento y el I_D en la cepa PO y a 25°C no evolucionan de la misma forma. La ratio aumenta al incrementarse la a_w , con óptimo a la a_w de 0.98, mientras que el I_D se comporta de manera contraria a la ratio, con valores altos a medida que la disponibilidad de agua disminuye. Se consiguen valores máximos de I_D en el

intervalo de 0.85 a 0.95 de a_w , con valor de 5 a las a_w de 0.90 y 0.95, y valor de 4 a 0.85 de a_w . Para las a_w de 0.98 y 0.995, el I_D es 2 y permanece invariable independientemente del ascenso de la a_w .

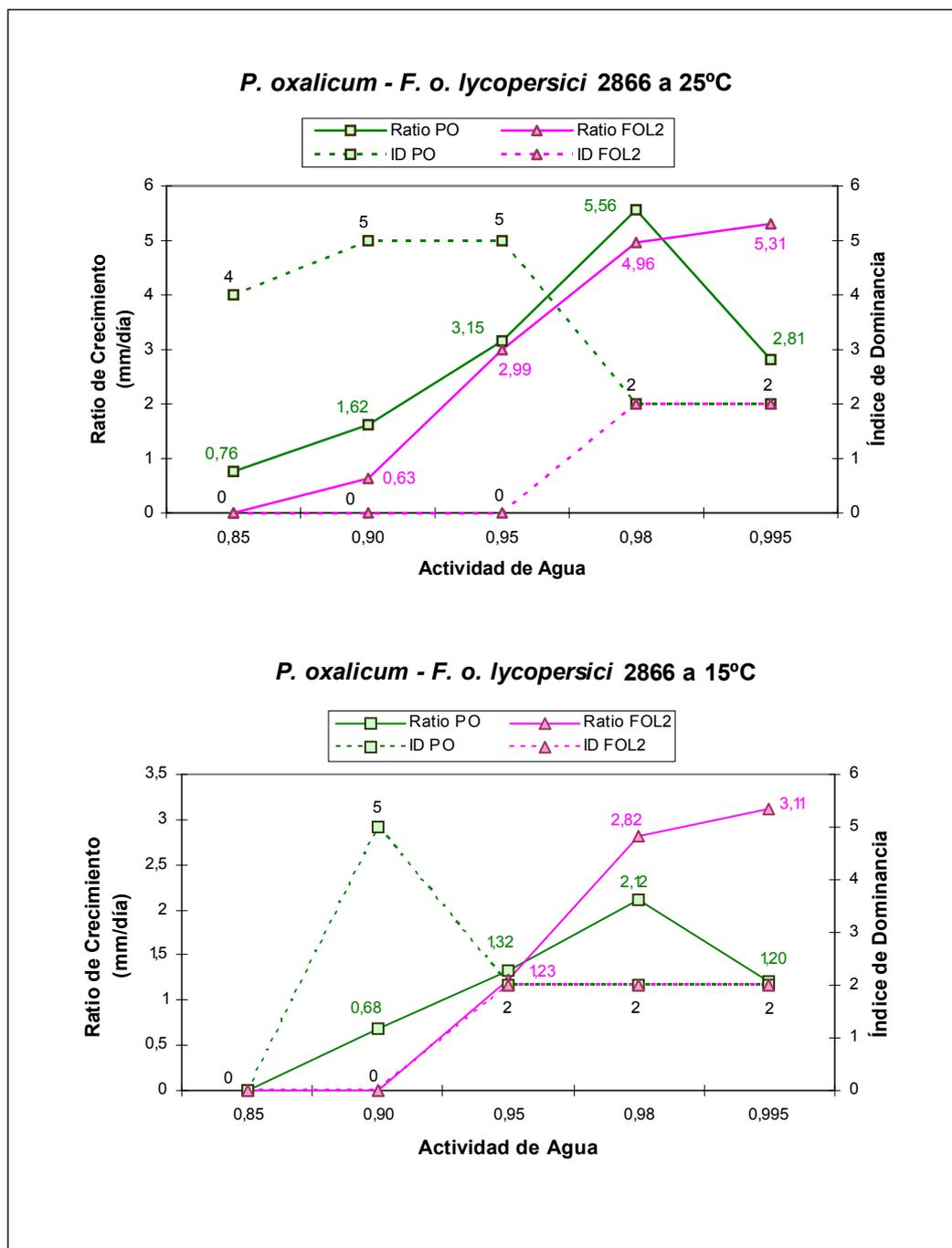


Figura 101: Relación entre la Ratio de Crecimiento y el I_D en la Interacción PO-FOL2 en función de la T.

Por otra parte, los valores de las ratios de crecimiento a 15°C son menores que a 25°C, y la ratio y el I_D tampoco muestran paralelismo (Figura X). Este mismo comportamiento de PO lo pudimos obtener cuando creció en común con FOL1, donde la evolución de la ratio de crecimiento es inversa a la del I_D en el intervalo entre 0.90 y 0.995 de a_w , y consiguiéndose el máximo I_D (valor 5) a la a_w donde el crecimiento es mínimo (0.90). También en PO y para la a_w de 0.95, el I_D pasa al valor 2, sin variar con el aumento de la a_w . Sin embargo, la ratio de crecimiento sigue incrementándose hasta llegar a 0.98 de a_w , valor en el que obtiene el máximo desarrollo.

Los resultados obtenidos para la cepa FOL2 a la temperatura de 25°C, reflejados en la Figura 101, muestran que el I_D es nulo en las a_w comprendidas entre 0.85 y 0.95. Esto mismo se observó en la cepa FOL1 de la interacción anterior, y es debido a que FOL2 no crece tampoco a la a_w de 0.85, y que también su crecimiento es inhibido por parte de la cepa PO en las demás a_w . Además, a medida que la a_w sigue aumentando, la ratio de crecimiento también lo hace, entretanto el I_D alcanza el valor 2 y se mantiene inalterable aunque la disponibilidad de agua sea mayor.

También a 15°C, la pauta que sigue el I_D y la ratio de crecimiento es similar a la de 25°C, pero los valores de crecimiento registrados son menores con el descenso de la temperatura. El I_D es igual a 2 en las a_w de 0.95 a 0.995, no obstante en los valores de menor a_w (0.85 y 0.90), la ratio y el I_D son nulos al no mostrar FOL2 crecimiento para esas a_w ; resultados que coinciden con los mostrados por FOL1.

En esta interacción (Figura 101), al igual que en la anterior (PO-FOL1), se observa la influencia, tan importante, que la a_w tiene sobre el crecimiento de FOL2, mientras que al I_D parece que no afectarle los cambios de a_w , al permanecer con el mismo valor con el incremento de la disponibilidad de agua. Igualmente, se pone de manifiesto que la divergencia entre la ratio y el I_D son las que favorecen a la cepa PO, facilitándole dominar en la interacción, así como inhibir y controlar el desarrollo de la cepa FOL2.

Se ha comprobado que en los hongos de campo y de almacén la competencia no está relacionada con el crecimiento, y que algunas las especies de *Penicillium*, como ocurre en esta interacción estudiada por nosotros, podían inhibir el crecimiento de los

competidores con ratios próximas al límite de crecimiento, siendo más competitivas para las a_w bajas.

De los resultados obtenidos se deduce que la cepa PO es capaz de controlar e inhibir el crecimiento de FOL2 siempre que las condiciones de a_w no sobrepasen el valor de 0.95 y que la temperatura sea de 25°C.

Además, el estudio “*in vitro*” entre PO y FOL2 ratifica lo reseñado por otros autores sobre la capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* frente a distintos patógenos de plantas. Y también apoya los estudios que demuestran la eficacia de *Penicillium oxalicum* como agente de biocontrol frente al causante de la fusariosis del tomate (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*), del mismo modo que en la interacción entre PO y FOL1.

5.3.3.- Interacción *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 - *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* CECT 2867

El Tipo de Interacción que establecen las cepas PO y FOL2 cuando son enfrentadas, a las a_w y T ensayadas, es el que aparece en la Tabla 39.

Tabla 39: Tipo de Interacción entre las cepas PO-FOG1 a las diferentes a_w y T.

Tipo de Interacción		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO / FOG1	D _{(PO)*}	E _(PO)	D _(PO)	B	B
15°C	PO / FOG1	D _{(PO)*}	E _(PO)	B	B	B

(Especie): La especie entre paréntesis es la especie inhibidora.
 - : No hay interacción. Ninguna de las dos especies ha crecido.
 * : El signo se añade cuando sólo crece una de las dos especies.

Las cepas PO y FOG1 en crecimiento dual y cuando las condiciones son de 25°C, establecen interacción de Tipo B, antagonismo mutuo por contacto a 0.98 y 0.995 de a_w , sin predominio de una cepa sobre la otra. Para valores de 0.95 de a_w o menores, el Tipo de Interacción cambia a dominancia por contacto (Tipo D) a las a_w de 0.85 y 0.95 (Figura 102), y a dominancia a distancia (Tipo E) en la a_w de 0.90. Cuando la a_w es de 0.85, la cepa PO, especie dominante de la interacción, es la que muestra crecimiento. Tanto en la inhibición por contacto como a distancia (Tipo D y E), la especie PO al ser más competitiva consigue dominar en las interacciones, inhibiendo el desarrollo de la cepa FOG1, y posteriormente continuar creciendo a través de la colonia de FOG1.

El Tipo de Interacción que se origina entre PO y FOG1 en las experiencias realizadas a la temperatura de 15°C, es de antagonismo mutuo por contacto (Tipo B), entre las a_w comprendidas entre 0.95 y 0.995, como se observa en la Figura 103; valores que se corresponden con las a_w en las que ambas cepas crecen en común.

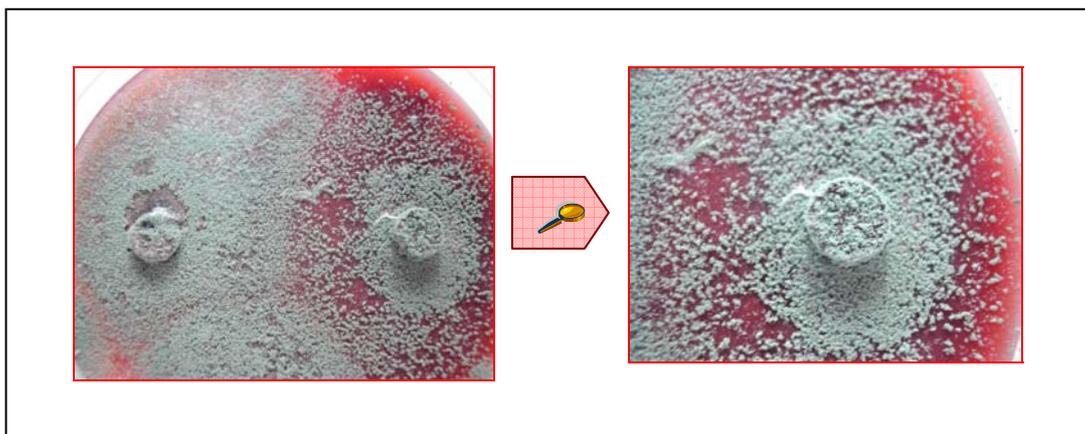


Figura 102: Interacción Tipo D entre PO-FOG1* a 25°C y 0.95 de a_w .



Figura 103: Interacción Tipo B entre PO-FOG1* a 15°C y 0.98 de a_w .

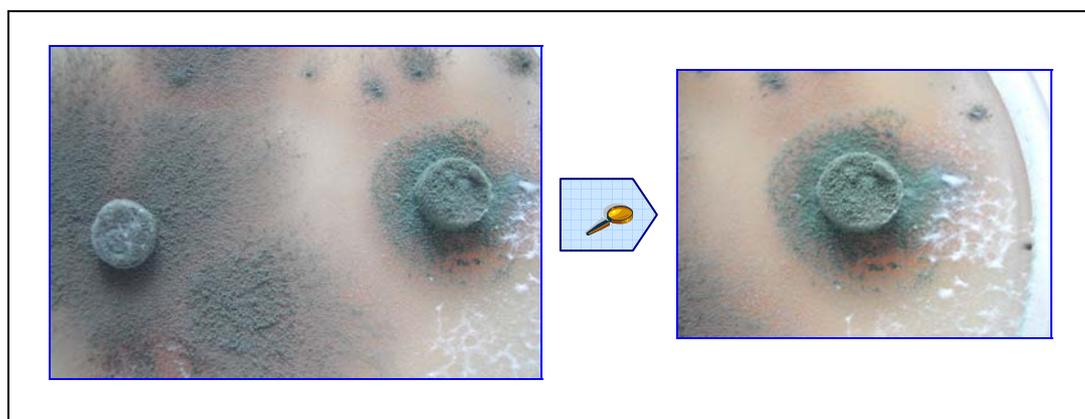


Figura 104: Interacción Tipo E entre PO-FOG1* a 15°C y 0.90 de a_w .

(*) PO es la colonia situada a la izquierda de la imagen.

Para las a_w de 0.85 y 0.90, se observa que hay inhibición por parte de la cepa PO sobre FOG1 y con posterior desarrollo de la especie inhibidora sobre la inhibida, produciéndose a 0.85 de a_w una inhibición por contacto (Tipo D), y a distancia (Figura 104) para una a_w de 0.90 (Tipo E).

Los estudios realizados por Companys (1996) y Marín y col. (1998 a y b) en otras especies de *Penicillium* y *Fusarium*, demuestran también que se produce un predominio de las especies de *Penicillium* sobre las de *Fusarium*, en aquellas condiciones en las que la a_w es menor. Sin embargo, y a diferencia de la cepa FOG1 estudiada en este trabajo, las especies de *Fusarium* con las que trabajaron fueron más competitivas para valores de a_w elevados.

En la Tabla 40 se muestran los valores numéricos obtenidos del I_D de las cepas PO y FOG1 según el Tipo de Interacción que establecen (Tabla 39) para cada combinación de a_w y T ensayadas.

Tabla 40: I_D de las cepas de la interacción PO-FOG1 a las diferentes a_w y T.

Índice de Dominancia (I_D)		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO / FOG1	4 / 0	5 / 0	4 / 0	2 / 2	2 / 2
15°C	PO / FOG1	4 / 0	5 / 0	2 / 2	2 / 2	2 / 2

En la Figura 105 se representan los gráficos del efecto de la a_w sobre la ratio de crecimiento y el I_D de las cepas PO y FOG1 enfrentadas, según la temperatura. Los valores para su representación son los que aparecen en la Tabla 40 y en la Tabla 25 del apartado 5.2.3.

Como se puede observar en la Figura 105, en la cepa PO, tanto a la temperatura de 15°C como a 25°C, no se aprecia paralelismo entre la ratio de crecimiento y el I_D . En las condiciones de a_w ensayadas, 0.85 a 0.995, la pauta que sigue la ratio de crecimiento es contraria a la del I_D . La ratio aumenta a medida que lo hace la a_w hasta llegar al valor

de 0.98, donde alcanza el máximo crecimiento, disminuyendo posteriormente para el valor de 0.995. Por el contrario, al I_D le corresponde un valor numérico bajo a mayor disponibilidad de agua.

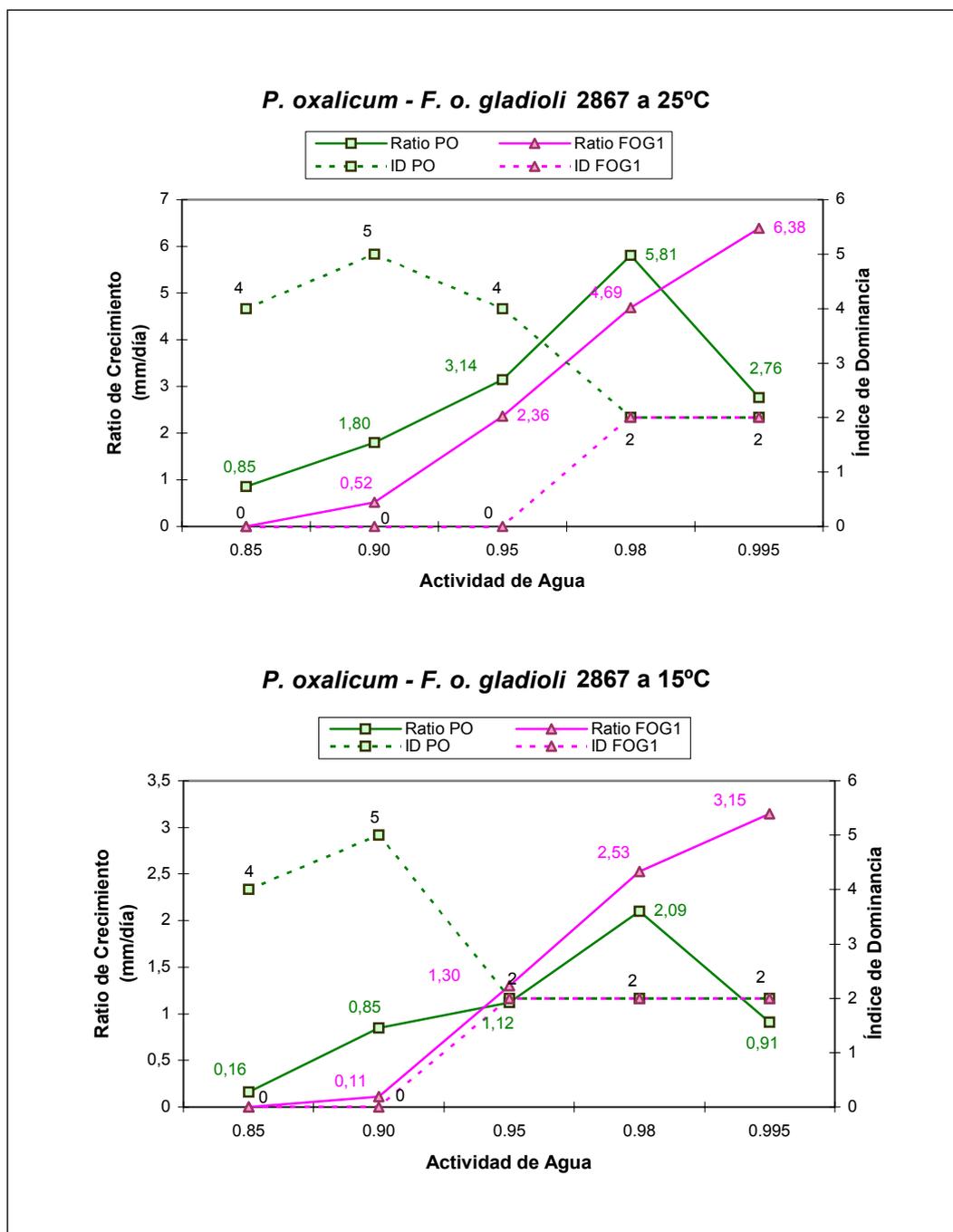


Figura 105: Relación entre la Ratio de Crecimiento y el I_D en la Interacción PO-FOG1 en función de la T.

Cuando los ensayos se realizaron a 25°C, el I_D fue máximo entre las a_w de 0.85 y 0.95, con valores de 4 a 0.85 y 0.95 de a_w , y de 5 a la a_w de 0.90. Para a_w más altas, 0.98 y 0.995, el I_D es 2, sin mostrar variación con el ascenso de a_w .

A la temperatura de 15°C, los máximos I_D , valor 4 y 5, se consiguen para unas a_w donde el crecimiento es bajo, a 0.85 y 0.90, respectivamente. Al incrementarse la a_w , el I_D desciende al valor 2 y se mantiene con el mismo valor entre 0.95 y 0.995 de a_w .

Respecto a la cepa FOG1 y a 25°C (Figura 105), el I_D es nulo en el intervalo de 0.85 a 0.95, por no presentar crecimiento la cepa a 0.85 de a_w , o bien porque su desarrollo es inhibido, en las demás a_w , por la cepa PO, al ser más competitiva en esas condiciones, aunque las ratios de crecimiento se incrementen con la mayor disponibilidad de agua. Para valores por encima de 0.95 de a_w , la ratio sigue incrementándose a medida que la cantidad de agua es mayor, no obstante, el I_D permanece con valor 2 para 0.98 y 0.995 de a_w .

A la temperatura de 15°C, la evolución de la ratio y el I_D es similar a la de 25°C, si bien los valores de crecimiento son menores que a 25°C. El I_D y la ratio, también, son nulos para las a_w de 0.85 y 0.90, al no crecer FOG1 y al inhibir PO el desarrollo de FOG1, respectivamente. En el intervalo de a_w de 0.95 a 0.995, el I_D , independientemente de que la disponibilidad de agua sea mayor, se mantiene constante con valor 2 entretanto los valores de crecimiento continúan aumentando al incrementar la a_w .

En la Figura 105 se pone de manifiesto, del mismo modo que en las interacciones estudiadas anteriormente, que la pauta discordante, entre la ratio de crecimiento y el I_D , mostrada por la cepa PO son las que le favorecen en la interacción, y por consiguiente, le permitirán controlar e inhibir el desarrollo de FOG1.

Este comportamiento de PO también fue observado por Companys (1996), Hill (1979) y Magan y Lacey (1984) en distintas especies de *Penicillium*, las cuales fueron más competitivas cuando presentaban ratios de crecimiento bajos, al igual que la cepa PO estudiada por nosotros.

A la vista de los resultados, podemos decir que la cepa PO posee mayor habilidad para competir y dominar sobre la cepa FOG1, cuando las condiciones de a_w sean menor o igual que 0.95 a 25°C, o bien igual o menor que 0.90 a 15°C.

El estudio “*in vitro*” entre PO y FOG1, también corrobora el comportamiento antagonista de *Penicillium oxalicum* frente a los agentes fitopatógenos de plantas, así como su gran potencial como agente de biocontrol frente a otras formas especiales de *Fusarium oxysporum*, distintas a las estudiadas en esta interacción interespecífica, como *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Al mismo tiempo, contribuye a demostrar el control de la podredumbre del cormo del gladiolo, ocasionada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*, el cual está escasamente referenciado (Mishra y col., 2000). Por ello, este estudio aporta nuevos datos sobre su control, utilizando como agente de control la especie *Penicillium oxalicum*, y ampliado, de ese modo, el número de agentes patógenos que *Penicillium oxalicum* es capaz de controlar.

5.3.4.- Interacción *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 - *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* CECT 2868

En la Tabla 41 se muestran los resultados obtenidos del Tipo de Interacción que las cepas PO y FOG2 presentan cuando crecen en común a las distintas a_w y T ensayadas.

Tabla 41: Tipo de Interacción entre las cepas PO-FOG2 a las diferentes a_w y T.

Tipo de Interacción		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO / FOG2	D _{(PO)*}	E _(PO)	E _(PO)	C	C
15°C	PO / FOG2	D _{(PO)*}	D _{(PO)*}	B	B	B

(Especie): La especie entre paréntesis es la especie inhibidora.
 - : No hay interacción. Ninguna de las dos especies ha crecido.
 * : El signo se añade cuando sólo crece una de las dos especies.

El Tipo de Interacción que establecen las cepas PO y FOG2, en crecimiento dual y a la temperatura de 25°C, es de antagonismo mutuo a distancia, sin dominio de una cepa sobre la otra (Tipo C), cuando la disponibilidad de agua es de 0.98 y 0.995 de a_w (Figuras 106 y 107), y de dominancia en las restantes a_w . Dominancia por contacto con inhibición de PO sobre FOG2 para 0.85 de a_w , aunque sólo crece la cepa inhibidora, mientras que a 0.90 y 0.95 la inhibición se produce a distancia, siendo también PO la cepa dominante, y por tanto la especie inhibidora de la interacción (Figura 108 y 109).

Cuando la temperatura es de 15°C, las dos cepas presentan un antagonismo mutuo por contacto en aquellas a_w en las que crecen en común, siendo éstas las comprendidas entre 0.95 y 0.995 de a_w , como se puede apreciar en la Figura 110. A las a_w por debajo de 0.95 se produce una inhibición por contacto, pero sólo la especie dominante es la que crece en esas a_w y nuevamente vuelve a ser la cepa PO.



Figura 106: Interacción Tipo C entre PO-FOG2* a 25°C y 0.995 de a_w .



Figura 107: Interacción Tipo C entre PO-FOG2* a 25°C y 0.98 de a_w .

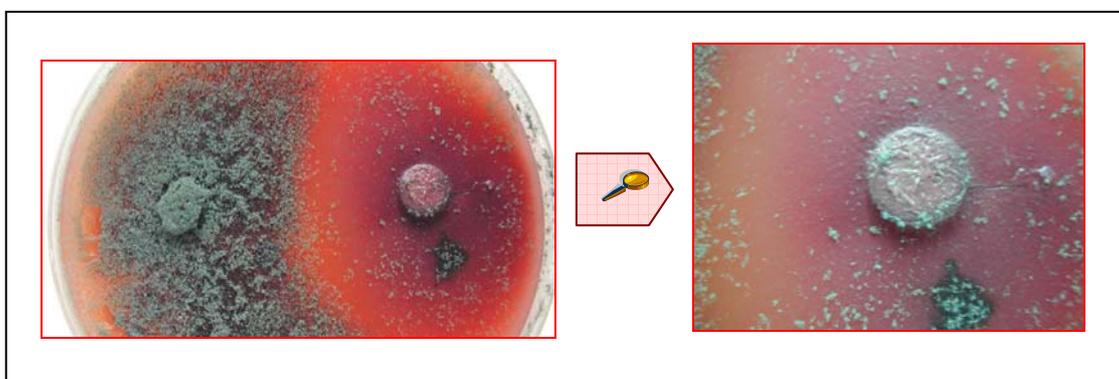


Figura 108: Interacción Tipo E entre PO-FOG2* a 25°C y 0.95 de a_w .



Figura 109: Interacción Tipo D entre PO-FOG2* a 25°C y 0.90 de a_w .

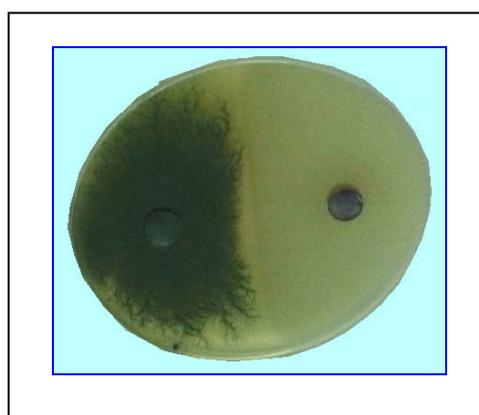


Figura 110: Interacción Tipo B entre PO-FOG2* a 15°C y 0.98 de a_w .

(*) PO es la colonia situada a la izquierda de la imagen.

Este dominio de PO sobre FOG2, también fue observado, anteriormente, entre PO y FOG1, cuando las condiciones de a_w no eran muy altas, si bien en otras especies de *Fusarium* se vio que fueron más competitivas que la cepa FOG2 estudiada en esta interacción interespecífica, sobre todo en los valores donde la disponibilidad de agua era máxima.

La Tabla 42 nos muestra los valores numéricos obtenidos del I_D de las cepas PO y FOG2 de acuerdo al Tipo de Interacción que establecen (Tabla 41) en cada combinación de a_w y T ensayadas.

Tabla 42: I_D de las cepas de la interacción PO-FOG2 a las diferentes a_w y T.

Índice de Dominancia (I_D)		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	PO / FOG2	4 / 0	5 / 0	5 / 0	3 / 3	3 / 3
15°C	PO / FOG2	4 / 0	4 / 0	2 / 2	2 / 2	2 / 2

La Figura 111 representa, gráficamente, el efecto de la a_w sobre la ratio de crecimiento y el I_D de las cepas PO y FOG2 enfrentadas, según la temperatura. Para su representación se han utilizado los valores de la Tabla 42 y los de la Tabla 27 del apartado 5.2.4.

En los gráficos se puede observar que en la cepa PO, para ambas temperaturas, no existe relación entre la ratio de crecimiento y el I_D , mostrando la misma pauta que en las interacciones entre PO y las distintas cepas de *F. oxysporum* estudiadas. Nuevamente, la ratio aumenta con el ascenso de la a_w hasta alcanzar el óptimo a 0.98 de a_w , y con posterior descenso a 0.995 de a_w , siendo los valores de crecimiento siempre menores a 15 que a 25°C. En cuanto al I_D , a mayor disponibilidad de agua menor es el valor numérico que se obtiene.

A la temperatura de 25°C, el I_D es máximo en las a_w comprendidas entre 0.85 y 0.95, y los valores que se alcanzan son de 4 a 0.85 de a_w , y de 5 en la a_w de 0.90 y 0.95. Para las a_w de 0.98 y 0.995, el I_D desciende al valor 3, y se mantiene invariable independientemente del aumento de la a_w .

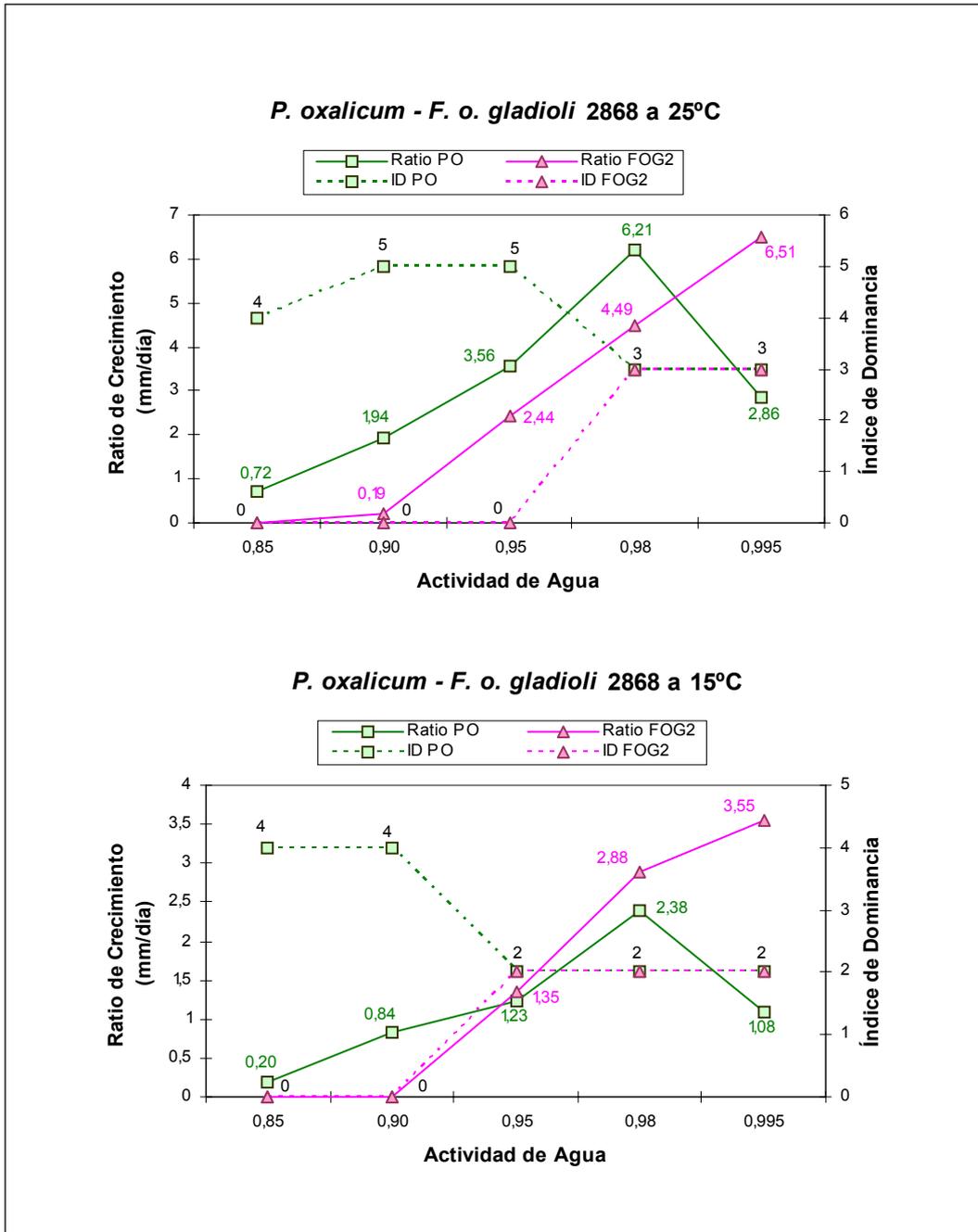


Figura 111: Relación entre la Ratio de Crecimiento y el I_D en la Interacción PO-FOG2 en función de la T.

Cuando la temperatura desciende a 15°C, el máximo I_D también se alcanza cuando los valores de a_w son más bajos, consiguiéndose un 4 a 0.85 y 0.90 de a_w . Sin embargo, el I_D no varía, valor 2, en ninguna de las a_w comprendidas entre 0.95 y 0.995, aunque aumente la disponibilidad de agua.

Como se observa en la Figura 111, si aumenta la a_w también lo hace la velocidad de crecimiento en la cepa FOG2, mientras que el I_D no se ve afectado por el aumento de la a_w , y esto se produce tanto a 15 como a 25°C. El I_D es nulo a las a_w de 0.85 y 0.90 a 15°C, y entre 0.85 a 0.95 a 25°C. A la a_w de 0.90 a 15°C y a 0.85 en las dos temperaturas por no mostrar crecimiento la cepa FOG2. Y en las restantes a_w , por verse inhibido su desarrollo, al presentar PO en esas condiciones mayor capacidad de competencia frente a FOG2. El I_D se mantiene constante con valor 3 en las a_w de 0.98 y 0.995 cuando la temperatura es de 25°C, y con valor 2 entre 0.95 y 0.995 a 15°C. Por el contrario, la ratio sigue incrementándose a medida que la disponibilidad de agua es mayor.

En la Figura 111 se pone de manifiesto, nuevamente, que la competencia entre las especies no siempre se produce en las condiciones donde éstas obtienen los mayores valores de crecimiento. Esa pauta divergente, entre ratio e I_D , es la que permitirá a PO dominar en la interacción, y por tanto inhibir el crecimiento de FOG2.

Estos resultados coinciden con los observados en otras especies de *Penicillium*, que fueron también más competitivas cuando las ratios de crecimiento eran bajas, como sucede con la cepa PO estudiada a lo largo de este trabajo.

En la interacción PO-FOG2 y tras los resultados obtenidos se deduce que la cepa PO posee mayor capacidad para competir y dominar a la cepa FOG2 cuando las condiciones de a_w sean menores o iguales que 0.95 a 25°C.

El estudio “*in vitro*” entre PO y FOG2 confirma el uso de *Penicillium oxalicum* como antagonista de los agentes fitopatógenos de plantas, así como su enorme capacidad como agente de biocontrol frente a otras formas especiales de *Fusarium oxysporum*, como hemos podido comprobar en las cuatro interacciones interespecíficas estudiadas.

Además, este estudio también demuestra que la cepa FOG2 puede controlar la podredumbre del corno del gladiolo, causada por la cepa *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. Por ello su control, concretamente, por *Penicillium oxalicum*, amplía el rango de agentes patógenos que es capaz de controlar.

5.3.5.- Interacción *Trichoderma harzianum* LBVB 1010 – *Rhizoctonia solani* CECT 2819

Los resultados del Tipo de Interacción que se obtienen cuando las cepas TH y RS crecen en común, en las condiciones de a_w y T ensayadas, son los que se muestran en la Tabla 43.

Tabla 43: Tipo de Interacción entre las cepas TH-RS a las diferentes a_w y T.

Tipo de Interacción		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	TH / RS	-	-	D _{(TH)*}	D _(TH)	D _(TH)
15°C	TH / RS	-	-	D _{(TH)*}	D _(TH)	D _(TH)

(Especie): La especie entre paréntesis es la especie inhibidora.
 - : No hay interacción. Ninguna de las dos especies ha crecido.
 * : El signo se añade cuando sólo crece una de las dos especies.

La interacción que establecen las cepas TH y RS, a las a_w de 0.98 y 0.995 y a las dos temperaturas, son siempre de dominancia por contacto (Tipo D), con posterior crecimiento de la especie dominante sobre la especie inhibida. En estas condiciones, la cepa TH fue más competitiva cuando la disponibilidad de agua era elevada, dominando e inhibiendo el crecimiento de RS (Figuras 112, 113, 115 y 116). Companys (1996) y Marín y col. (1998 a) también observaron que, para a_w altas, *Trichoderma viride* era capaz de inhibir a las otras especies con las que se enfrentó.

La cepa TH muestra para las dos temperaturas y a la a_w de 0.95, una interacción también de tipo D, pero en esas circunstancias sólo se desarrolla una de las dos cepas enfrentadas, siendo ésta la especie dominante de toda la experiencia, que en nuestro caso es TH (Figura 114).

Por el contrario, para las a_w de 0.85 y 0.90 no se produce interacción entre ambas cepas, al no crecer ninguna de ellas en esas a_w , ni a 15 ni a 25°C.

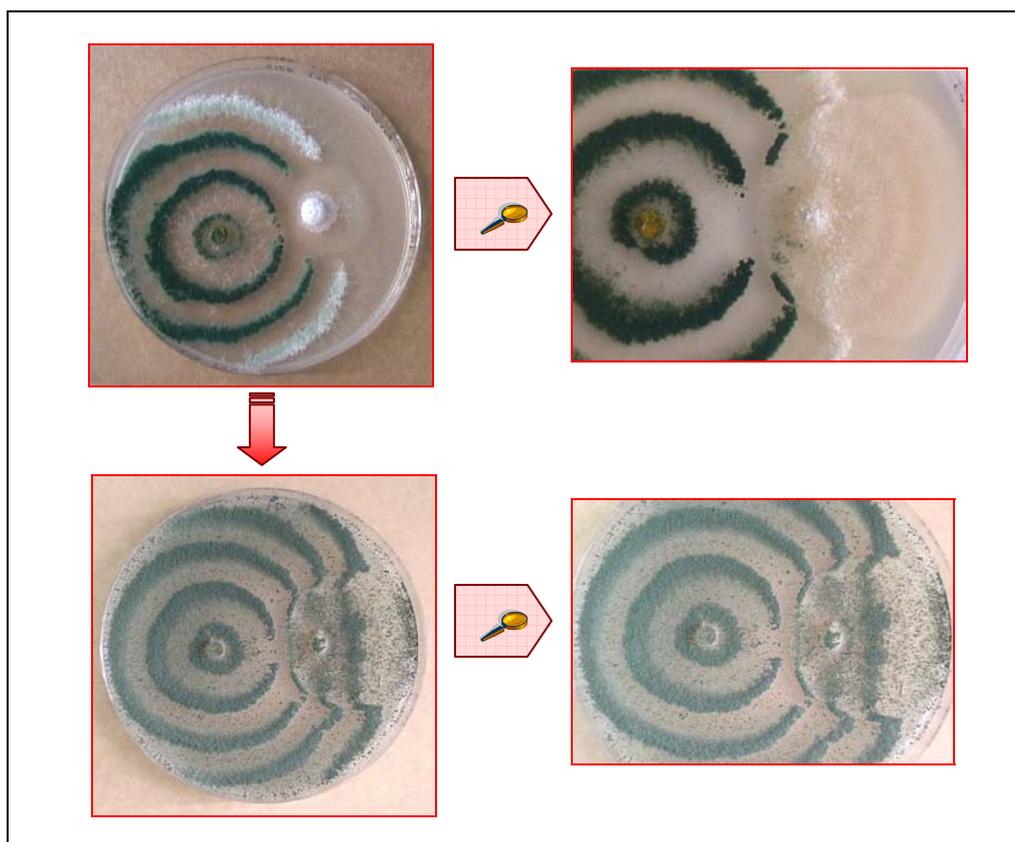


Figura 112: Interacción Tipo D entre TH-RS* a 25°C y 0.995 de a_w .

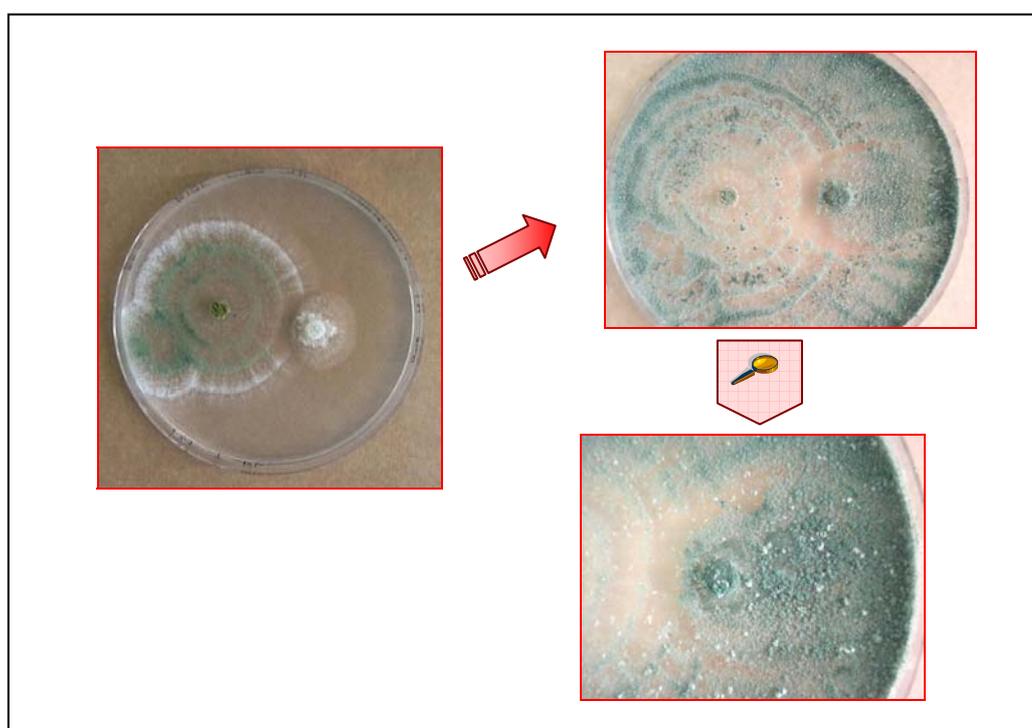


Figura 113: Interacción Tipo D entre TH-RS* a 25°C y 0.98 de a_w .

(*) TH es la colonia situada a la izquierda de la imagen.

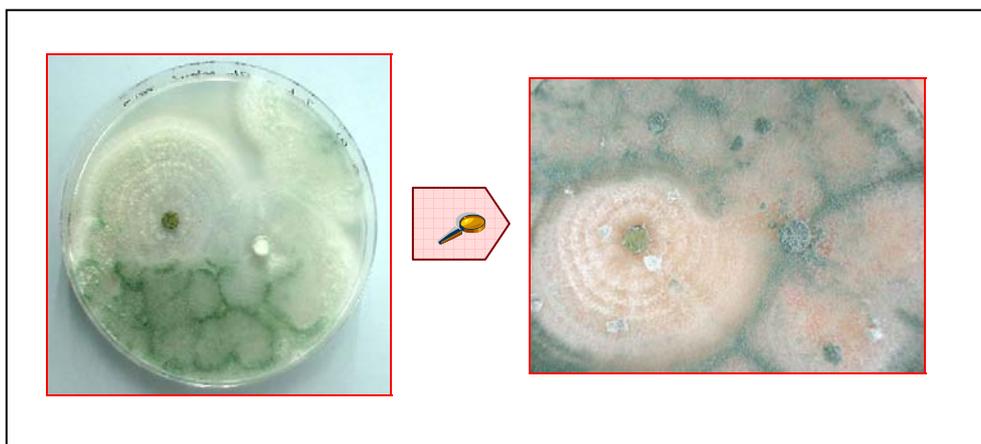


Figura 114: Interacción Tipo D entre TH-RS* a 25°C y 0.95 de a_w .

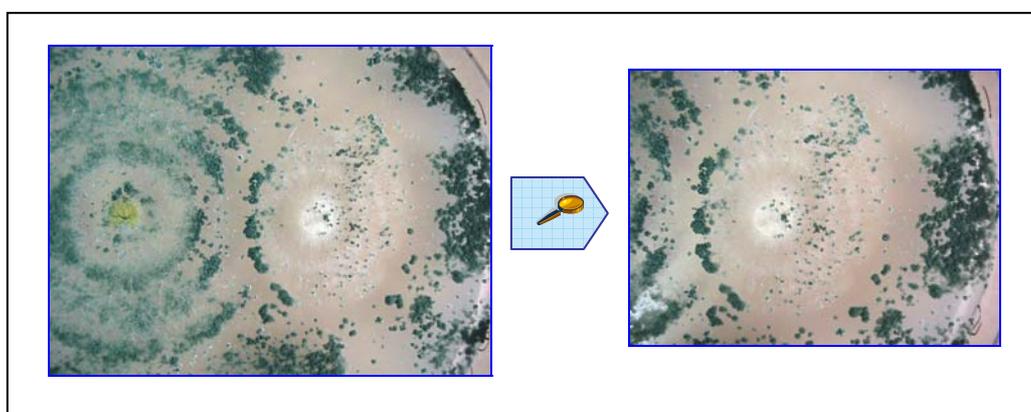


Figura 115: Interacción Tipo D entre TH-RS* a 15°C y 0.995 de a_w .

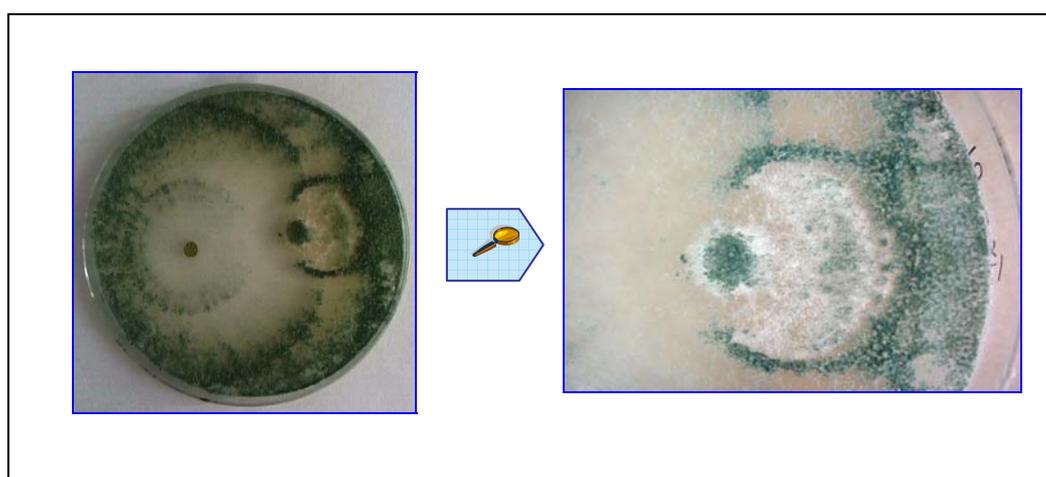


Figura 116: Interacción Tipo D entre TH-RS* a 15°C y 0.98 de a_w .

(*) TH es la colonia situada a la izquierda de la imagen.

En la Tabla 44 se indican los valores numéricos obtenidos del I_D de las cepas TH y RS, para cada combinación de a_w y T estudiadas, según el Tipo de Interacción mostrado en la Tabla 43.

Tabla 44: I_D de las cepas de la interacción TH-RS a las diferentes a_w y T.

Índice de Dominancia (I_D)		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	TH / RS	0 / 0	0 / 0	4 / 0	4 / 0	4 / 0
15°C	TH / RS	0 / 0	0 / 0	4 / 0	4 / 0	4 / 0

En los gráficos de la Figura 117 se representa el efecto de la a_w sobre la velocidad de crecimiento y el I_D de las cepas TH y RS enfrentadas, según la temperatura. Los valores utilizados para su representación son los que aparecen en la Tabla 44 y en la Tabla 29 del apartado 5.2.5.

En la cepa TH se observa, tanto a 15 como a 25°C, que la velocidad de crecimiento asciende, a medida que se incrementa la a_w , en el intervalo de crecimiento de 0.95 a 0.995 de a_w (Figura 117). En ese intervalo cabe destacar que, aunque aumente la a_w , el I_D no varía y alcanza valores altos de I_D , valor 4, en todas las a_w del mismo. La existencia de elevados I_D de TH en la interacción estudiada permite controlar a RS.

No obstante, la velocidad de crecimiento sufre un importante descenso al disminuir la temperatura de 25 a 15°C, mientras que el I_D no varía y se mantiene constante con valor 4. Por lo que la temperatura y los niveles de a_w en los que la cepa crece no parecen influir en el I_D , pero sí que tienen efecto en la velocidad de crecimiento. Esto pone de manifiesto la habilidad que presenta TH como agente de biocontrol para competir y dominar en un amplio rango de condiciones.

En las temperaturas ensayadas y para las a_w de 0.85 y 0.90, el I_D es nulo al no desarrollarse esta cepa en esas a_w , como se indicó anteriormente cuando se estudió esta cepa en crecimiento individual y dual.

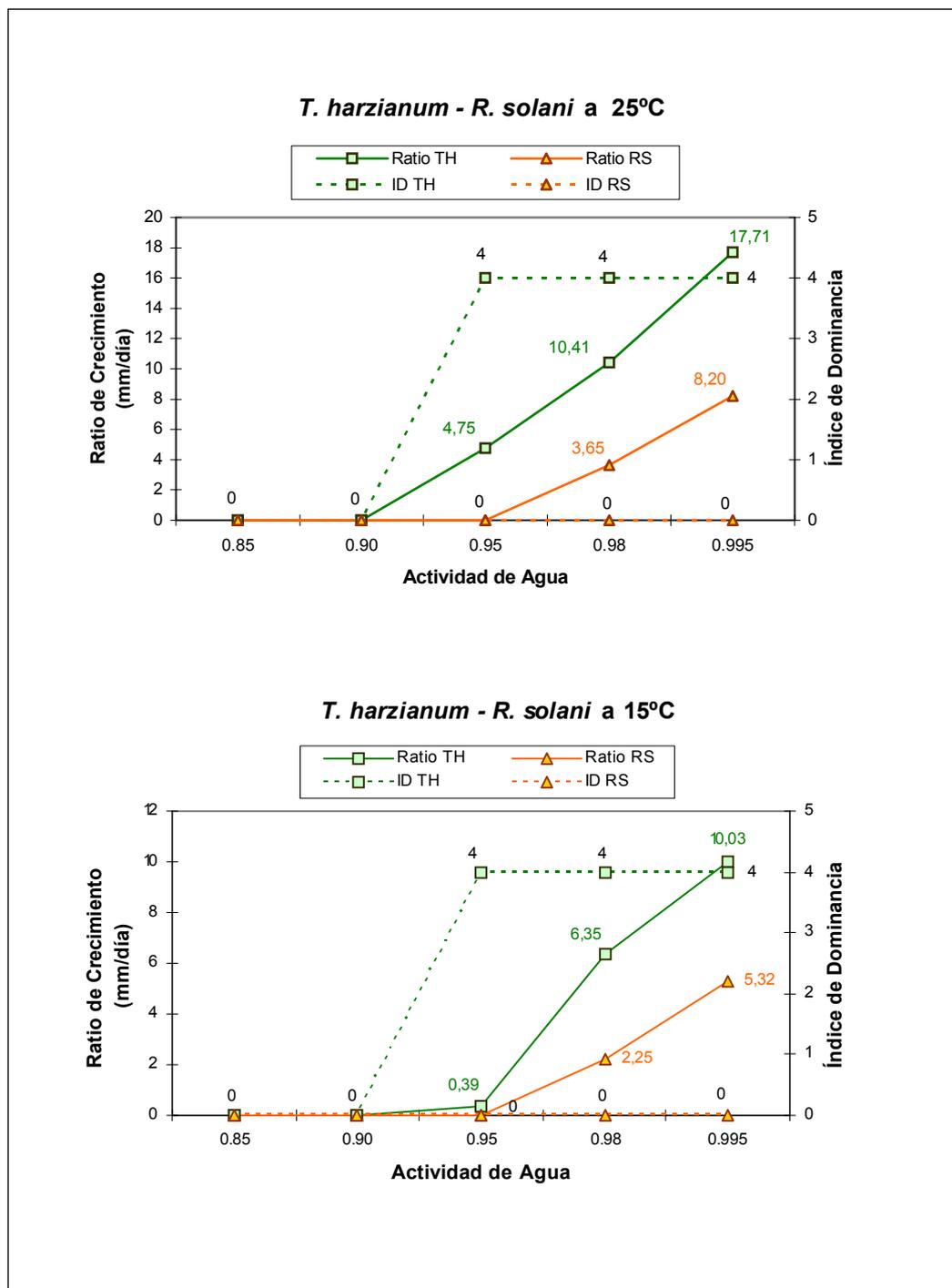


Figura 117: Relación entre la Ratio de Crecimiento y el I_D en la interacción TH-RS en función de la T.

Respecto a la cepa RS e independientemente de la temperatura (Figura 117), los valores de crecimiento, en aquellas a_w en las que crece (0.98 y 0.995), se incrementan conforme aumenta la a_w , pero dichos valores experimentan un descenso cuando la temperatura disminuye de 25 a 15°C.

El valor del I_D para la cepa RS es nulo en todas las combinaciones de a_w y T estudiadas. Esto se debe a que en las a_w de 0.85 a 0.95 no hubo crecimiento de la cepa, y porque en las a_w donde puede crecer, la cepa TH inhibió su desarrollo, al establecerse, entre ambas, interacciones Tipo D, lo que revela que RS es un hongo de fácil control por TH. Por ello, en la cepa RS no se observa relación entre las ratios de crecimiento y el I_D , por ser éste nulo.

Además, en todas las condiciones en las que ambas cepas crecieron, TH presentó ratios de crecimiento mayores que RS, y esa superioridad se manifiesta con altos valores de I_D , que utilizará para dominar en la interacción.

En la Figura 117 queda de manifiesto el total predominio de la cepa TH sobre la cepa RS durante toda la experiencia. TH continuó creciendo a través de la colonia de RS, no dejándola crecer en la zona donde se ponen en contacto las dos cepas, y viéndose obligada RS a continuar creciendo hacia la zona opuesta de la interacción, como se puede observar en las imágenes de las Figuras 112 y 116.

Los resultados obtenidos de los I_D nos demuestran que TH es un hongo capaz de controlar e inhibir el desarrollo de RS cuando los factores ambientales de a_w sean superiores a 0.90.

El hecho de que TH sea capaz de inhibir el crecimiento de RS en la interacción aquí estudiada, reafirma los estudios, que sobre este género se han llevado a cabo, y en concreto de la especie *T. harzianum*, sobre su capacidad antagonista frente *Rhizoctonia solani*, que causa daños significativos en los cultivos (Bari y col., 2000; Bunker y Mathur, 2001; Camporota, 1985; Elad y col., 1987; Geeta y col., 2001; Hadar y col., 1979; Hassanein y col., 2000; Lartey y col., 1994; Latunde, 1991; Patricio y col., 2001; Rajeev y Mukhopadhyay, 2001; Sabet y col., 2000; Samaniego y Gámez, 2000; Sanjay y Kaushir, 2001; Srivastava y Singh, 2000; Sudhakar y col., 1998; Tronsmo, 1996).

5.3.6.- Interacción *Trichoderma harzianum* LBVB 1010– *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CECT 2715

El Tipo de Interacción que presentan las cepas TH y FOL1 cuando son enfrentadas en crecimiento dual a las a_w y T ensayadas, son los que se reflejan en la Tabla 45.

Tabla 45: Tipo de Interacción entre las cepas TH-FOL1 a las diferentes a_w y T.

Tipo de Interacción		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	TH / FOL1	-	-	D _(TH)	D _(TH)	D _(TH)
15°C	TH / FOL1	-	-	B	D _(TH)	D _(TH)

(Especie): La especie entre paréntesis es la especie inhibidora.
 - : No hay interacción. Ninguna de las dos especies ha crecido.

Las cepas TH y FOL1 establecen interacciones de Tipo D, dominancia por contacto con desarrollo posterior de la cepa dominante, a la misma o menor velocidad, a través de la colonia inhibida, cuando la disponibilidad de agua es alta (0.98 y 0.995 de a_w) y la temperatura de 15 y 25°C. En esas condiciones, como se puede observar en las imágenes de las Figuras 118, 119, 121 y 122, la especie dominante y por tanto la inhibidora de la interacción es la cepa TH. Se obtuvieron resultados semejantes a 25°C con la especie *T. viride* cuando ésta interaccionó con otras especies de *Fusarium*, como indicamos en la interacción interespecífica anteriormente comentada.

Cuando la a_w disminuye al valor de 0.95, las dos cepas, también, forman interacción de Tipo D, con dominancia e inhibición de TH sobre RS a 25°C (Figura 120), mientras que cuando la temperatura desciende a 15°C, el antagonismo mutuo fue lo más común, con inhibición mutua por contacto por parte de ambas cepas, y sin predominio de una sobre la otra (Figura 123).

Para las a_w de 0.85 y 0.90, y a las dos temperaturas, ambas especies no interactúan por no mostrar desarrollo, por lo que no hay interacción entre ellas.

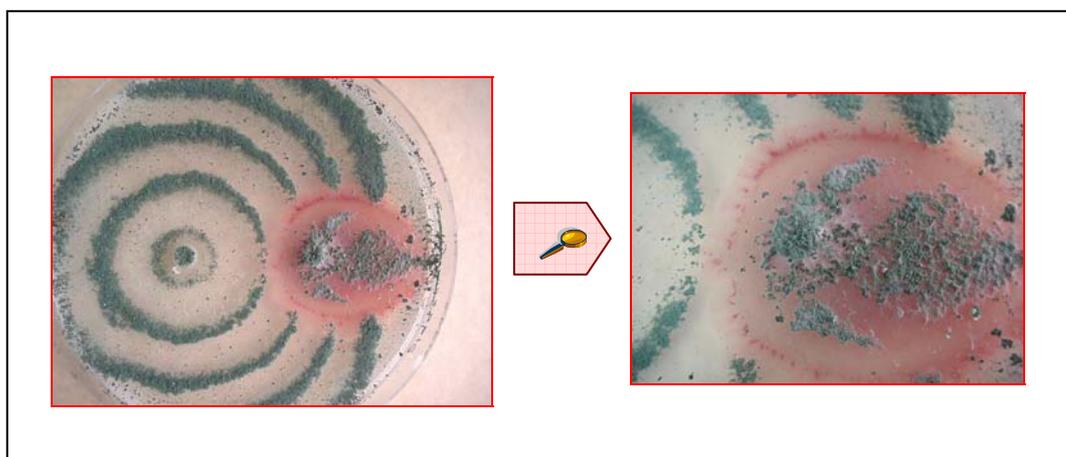


Figura 118: Interacción Tipo D entre TH-FOL1* a 25°C y 0.995 de a_w .

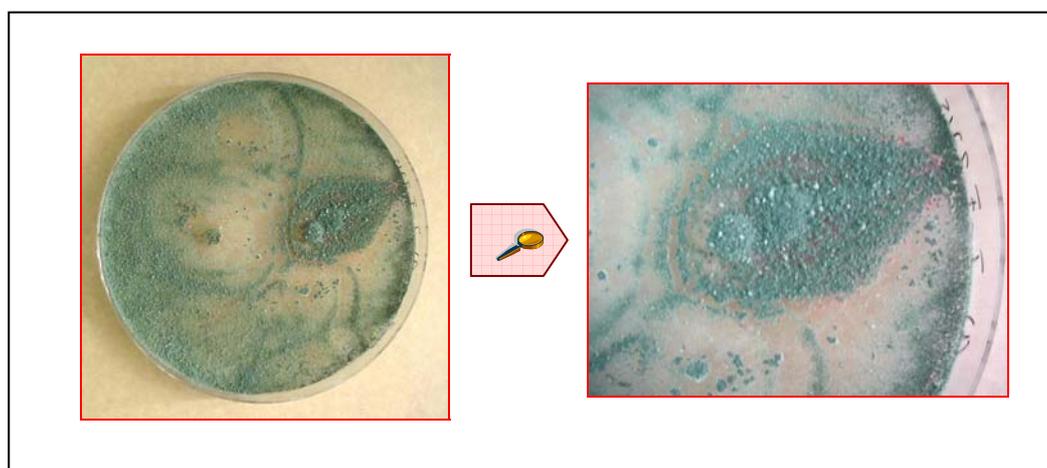


Figura 119: Interacción Tipo D entre TH-FOL1* a 25°C y 0.98 de a_w .

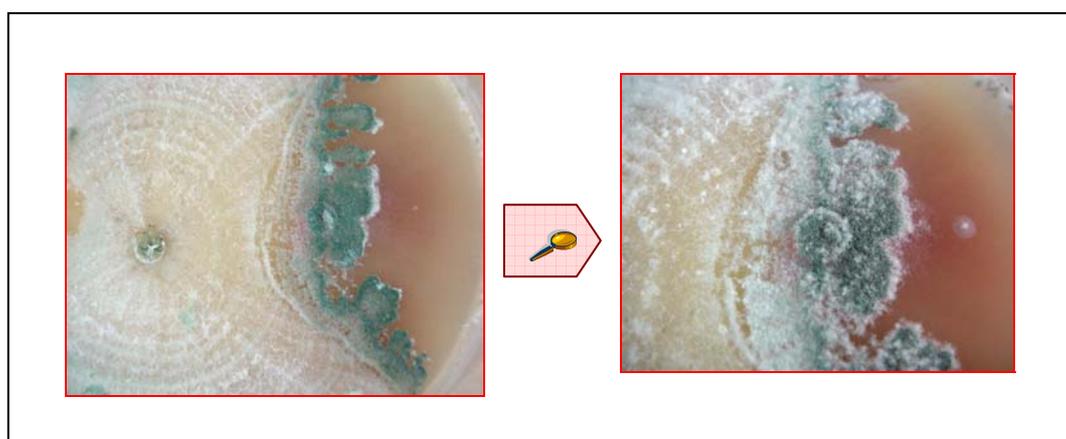


Figura 120: Interacción Tipo D entre TH-FOL1* a 25°C y 0.95 de a_w .

(*) TH es la colonia situada a la izquierda de la imagen.

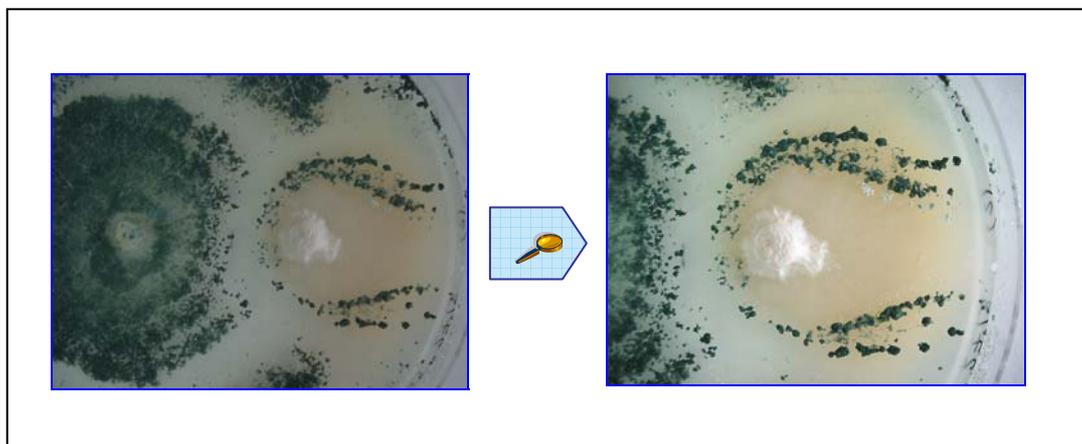


Figura 121: Interacción Tipo D entre TH-FOL1* a 15°C y 0.995 de a_w .

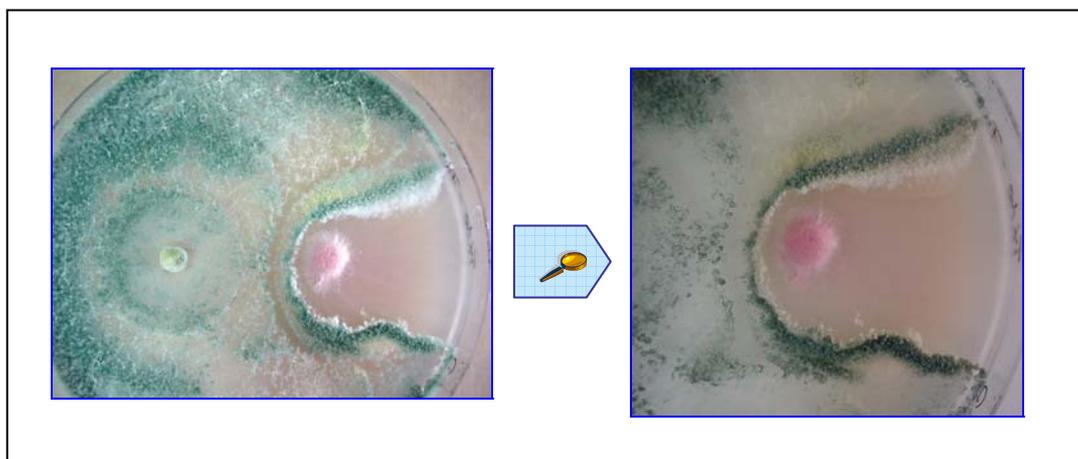


Figura 122: Interacción Tipo D entre TH-FOL1* a 15°C y 0.98 de a_w .

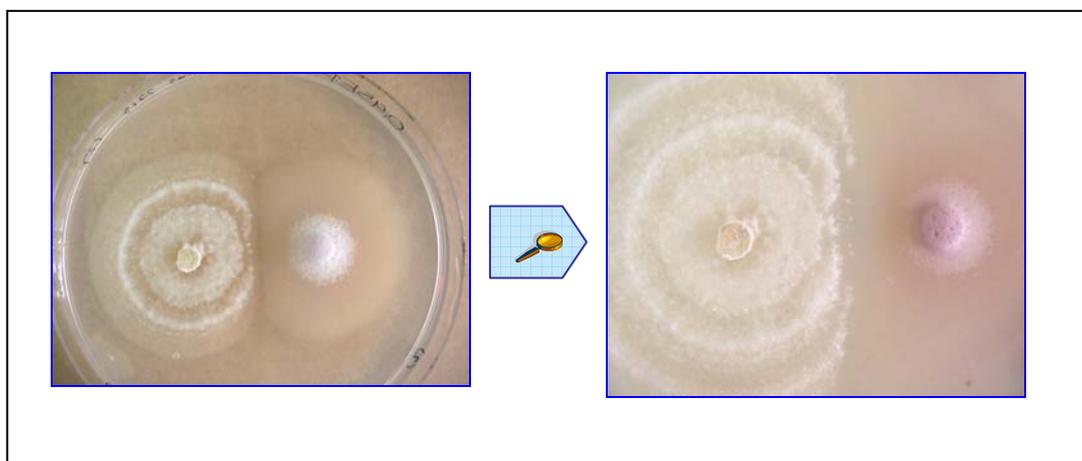


Figura 123: Interacción Tipo B entre TH-FOL1* a 15°C y 0.95 de a_w .

(*) TH es la colonia situada a la izquierda de la imagen.

En la Tabla 46 se muestran los valores numéricos obtenidos del I_D de las cepas TH y FOL1, según el Tipo de Interacción que establecen (Tabla 45) y para cada combinación de a_w y T ensayadas.

Tabla 46: I_D de las cepas de la interacción TH-FOL1 a las diferentes a_w y T.

Índice de Dominancia (I_D)		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	TH / FOL1	0 / 0	0 / 0	4 / 0	4 / 0	4 / 0
15°C	TH / FOL1	0 / 0	0 / 0	2 / 2	4 / 0	4 / 0

En la Figura 124 se representa, de forma comparativa, los gráficos del efecto de la a_w sobre la ratio de crecimiento y el I_D de las cepas TH y FOL1 en función de la temperatura. Para su representación se han utilizado los datos de la Tabla 46 y de la Tabla 31 del apartado 5.2.6.

En el gráfico se puede apreciar que en la cepa TH y a 25°C, la ratio de crecimiento aumenta al aumentar la a_w de 0.90 a 0.995; sin embargo el I_D no experimenta variación al incrementarse la a_w , y obtiene rápidamente valores altos I_D , valor 4, en las tres a_w donde muestra desarrollo, manteniéndose constante en todas ellas.

Cuando la temperatura es de 15°C, la ratio de crecimiento sigue la misma evolución que a 25°C, aumentando a medida que la disponibilidad de agua es mayor, pero los valores de crecimiento que se alcanzan son menores. El I_D también es mayor al aumentar la a_w de 0.90 a 0.98, pasando del valor 2 a 0.95 de a_w , al valor 4 a 0.98 de a_w , y manteniéndose para una a_w de 0.995.

Por tanto, cuando la temperatura es de 15°C, la velocidad de crecimiento y el I_D se ven influenciados por los valores de a_w en los que la cepa crece. Sin embargo a mayor temperatura, 25°C, el efecto de la a_w sólo repercute en los valores de crecimiento, no afectando al I_D que alcanza fácilmente el máximo valor, lo que le permite tener mayor posibilidad de competencia en la interacción.

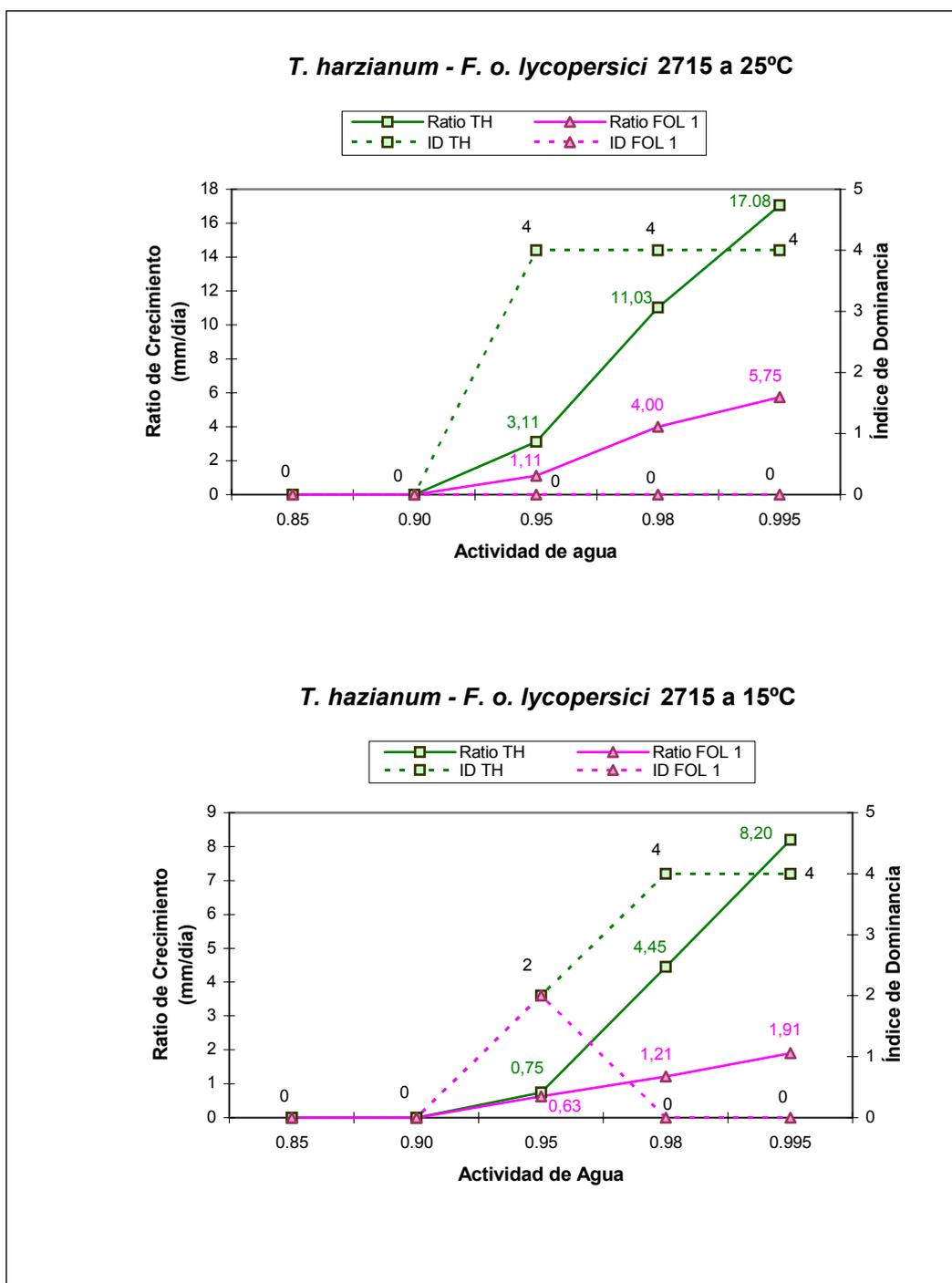


Figura 124: Relación entre la Ratio de Crecimiento y el I_D en la interacción TH-FOL1 en función de la T.

En cuanto a la cepa FOL1 y a 25°C (Figura 124), aunque al aumentar la a_w también lo hace la ratio de crecimiento, el I_D es nulo, al verse inhibido su crecimiento

por la cepa TH, cuando la disponibilidad de agua aumenta a partir de 0.90 de a_w . A esta temperatura no se establece relación entre el I_D y la ratio de crecimiento.

Por el contrario a 15°C, la ratio de crecimiento y el I_D se comportan del mismo modo para la a_w de 0.95, aumentando la a_w , la ratio y el I_D , donde éste obtiene el valor 2. Para niveles más altos de a_w , las ratios de crecimiento aumentan, no haciéndolo así el I_D que es nulo, al producirse una interacción de Tipo D y ser la cepa TH la especie dominante e inhibidora de la interacción, no dejando, por tanto, crecer a FOL1. En estas circunstancias se observa que la a_w tiene una influencia parcial sobre el crecimiento y el I_D de la cepa FOL1, y esto ocurre únicamente cuando el valor de a_w es de 0.95; en los restantes niveles de a_w no se aprecia relación entre ratio e I_D .

Tanto en TH como en FOL1 y a las dos temperaturas, el I_D es nulo para las a_w de 0.85 y 0.90, al no desarrollarse ninguna de las dos cepas en esas condiciones de la interacción.

En la Figura 124 se observa que TH, a 25°C y en las a_w donde ambas cepas crecen en común, presenta siempre mayores ratios de crecimiento, así como valores más altos de I_D que FOL1; lo que nos indica que TH posee mayor capacidad para competir en esas condiciones de la interacción. Cuando la temperatura es de 15°C y para a_w de 0.98 y 0.995, también las ratios y el I_D de TH son más altos que los obtenidos por FOL1, siendo esos valores los que le favorecen como agente de control. No obstante, para una a_w de 0.95 no se observan casi diferencias en las ratios de las dos especies, y el I_D es el mismo para ambas, produciéndose un antagonismo mutuo pero sin predominio de una sobre la otra.

Los resultados del I_D nos indican que TH es un hongo capaz de controlar e inhibir el crecimiento de FOL1, siempre que las condiciones de a_w sean mayores que 0.90 a 25°C, y por encima de 0.95 a 15°C.

Además, este estudio corrobora el comportamiento antagonista de las especies de *Trichoderma*, entre ellas *T. harzianum*, referenciado por otros autores (Amadioha, 1999; Kurzawinska y Pacyna, 2000; Larkin y Fravel, 1998; Niknejad-Kazempour y col., 2000; Sabet y col., 2000; Sarhan y col., 2000), demostrando poder controlar la fusariosis vascular del tomate causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

5.3.7.- Interacción *Trichoderma harzianum* LBVB 1010 – *Verticillium dahliae* CECT 2694

En la Tabla 47 se muestra los resultados del Tipo de Interacción que las cepas TH y VD presentan cuando crecen en común a las distintas de a_w y T ensayadas.

Tabla 47: Tipo de Interacción entre las cepas TH-VD a las diferentes a_w y T.

Tipo de Interacción		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	TH / VD	-	-	D _{(TH)*}	D _(TH)	D _(TH)
15°C	TH / VD	-	-	D _{(TH)*}	D _(TH)	D _(TH)

(Especie): La especie entre paréntesis es la especie inhibidora.

- : No hay interacción. Ninguna de las dos especies ha crecido.

* : El signo se añade cuando sólo crece una de las dos especies.

El Tipo de Interacción que establecen las cepas TH y VD es de Tipo D, inhibición por contacto, en las a_w de 0.98 y 0.995 e independientemente de la temperatura; con posterior crecimiento de la especie inhibidora sobre la especie inhibida, como se puede apreciar en las imágenes de las Figuras 125, 126, 128 y 129. La cepa TH fue mejor competidora, y por ello la especie dominante de la interacción, inhibiendo el desarrollo de VD. Este mismo comportamiento se observó en la especie *T. viride* cuando interactuó con otras especies (Companys, 1996; Marín y col., 1998 a).

Además, se observa que al disminuir la a_w al valor de 0.95, la interacción que se origina también es de Tipo D en ambas temperaturas, pero en este caso solo crece la cepa dominante, que nuevamente es la cepa TH (Figura 127).

Cuando las condiciones son a 0.85 y 0.90 de a_w y a las dos temperaturas, las cepas no interactúan, al no mostrar ninguna de ellas desarrollo.

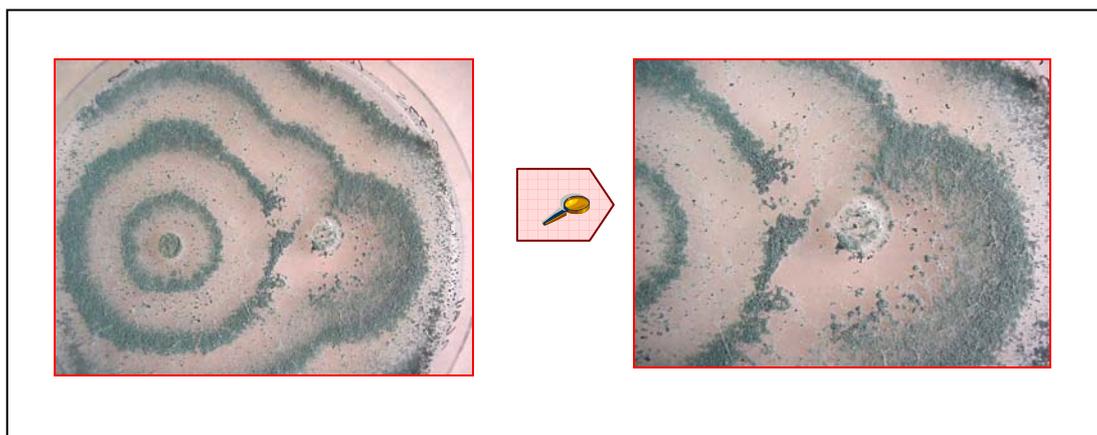


Figura 125: Interacción Tipo D entre TH-VD* a 25°C y 0.995 de a_w .



Figura 126: Interacción Tipo D entre TH-VD* a 25°C y 0.98 de a_w .

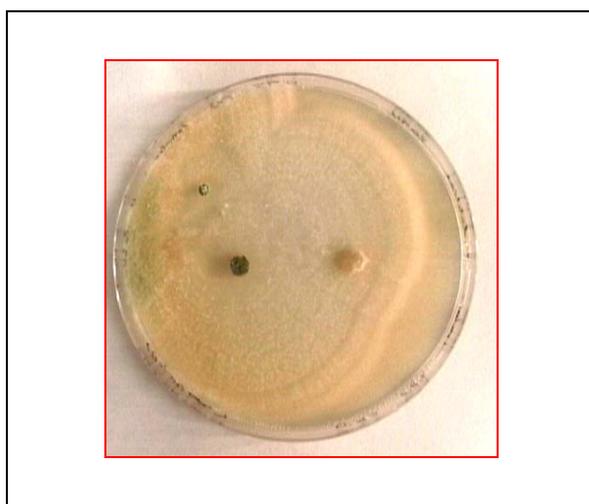


Figura 127: Interacción Tipo D entre TH-VD* a 25°C y 0.95 de a_w .

(*) TH es la colonia situada a la izquierda de la imagen.

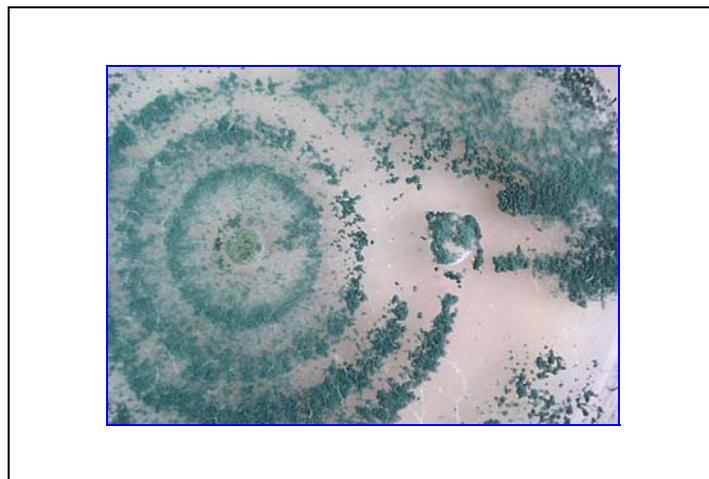


Figura 128: Interacción Tipo D entre TH-VD* a 15°C y 0.995 de a_w .

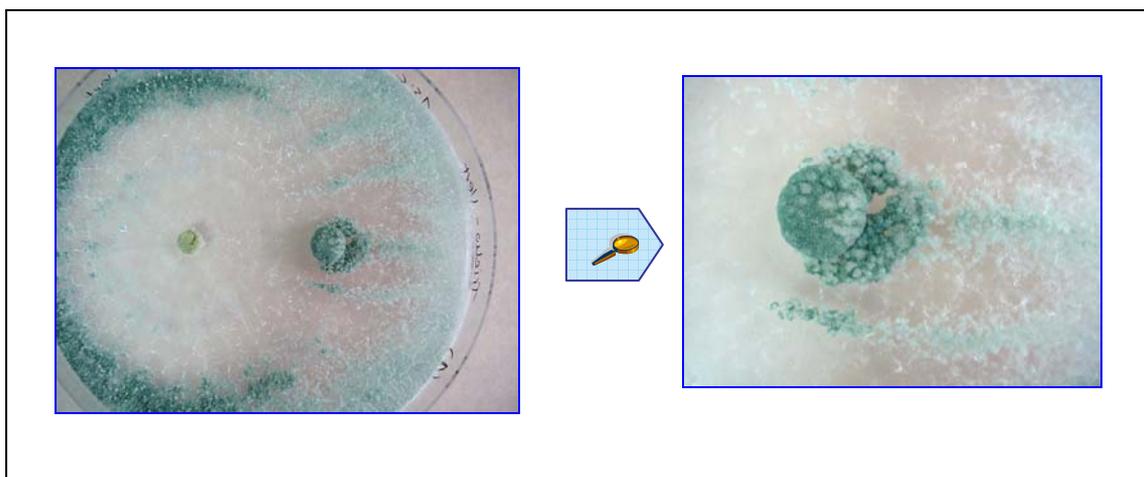


Figura 129: Interacción Tipo D entre TH-VD* a 15°C y 0.98 de a_w .

(*) TH es la colonia situada a la izquierda de la imagen.

La Tabla 48 nos muestra los valores numéricos obtenidos del I_D de las cepas TH y VD, para cada combinación de a_w y T ensayadas, según el Tipo de Interacción mostrado en la Tabla 47.

Tabla 48: I_D de las cepas de la interacción TH-VD a las diferentes a_w y T.

Índice de Dominancia (I_D)		a_w				
		0.85	0.90	0.95	0.98	0.995
25°C	TH / VD	0 / 0	0 / 0	4 / 0	4 / 0	4 / 0
15°C	TH / VD	0 / 0	0 / 0	4 / 0	4 / 0	4 / 0

En los gráficos de la Figura 130 se representa el efecto de la a_w sobre la velocidad de crecimiento y el I_D de las cepas TH y VD en función la temperatura. Los datos utilizados para su representación son los que se muestran en la Tabla 48 y en la Tabla 33 del apartado 5.2.7.

En la cepa TH se observa, a las temperaturas estudiadas, que a medida que aumenta la a_w , a partir del valor de 0.90, también lo hace la velocidad de crecimiento. Sin embargo, el I_D se eleva rápidamente tomando el valor 4; valor que se mantiene aunque se incremente la disponibilidad de agua en el intervalo de 0.95 a 0.995 de a_w .

El descenso en la temperatura de 25 a 15°C ocasiona una mengua en la velocidad de crecimiento, pero el I_D no se ve afectado por esta disminución y se mantiene con el mismo valor de 4 que tenía a 25°C. Por ello, la temperatura y los distintos niveles de a_w no parecen influir en el I_D ; lo que pone de manifiesto la capacidad de este hongo de competir y dominar, en un amplio rango de condiciones, haciéndolo deseable como agente de control.

El I_D ha sido nulo, tanto en las experiencias realizadas a 15 como a 25°C, cuando la disponibilidad de agua era de 0.85 y 0.90, puesto que no mostró crecimiento en estas condiciones.

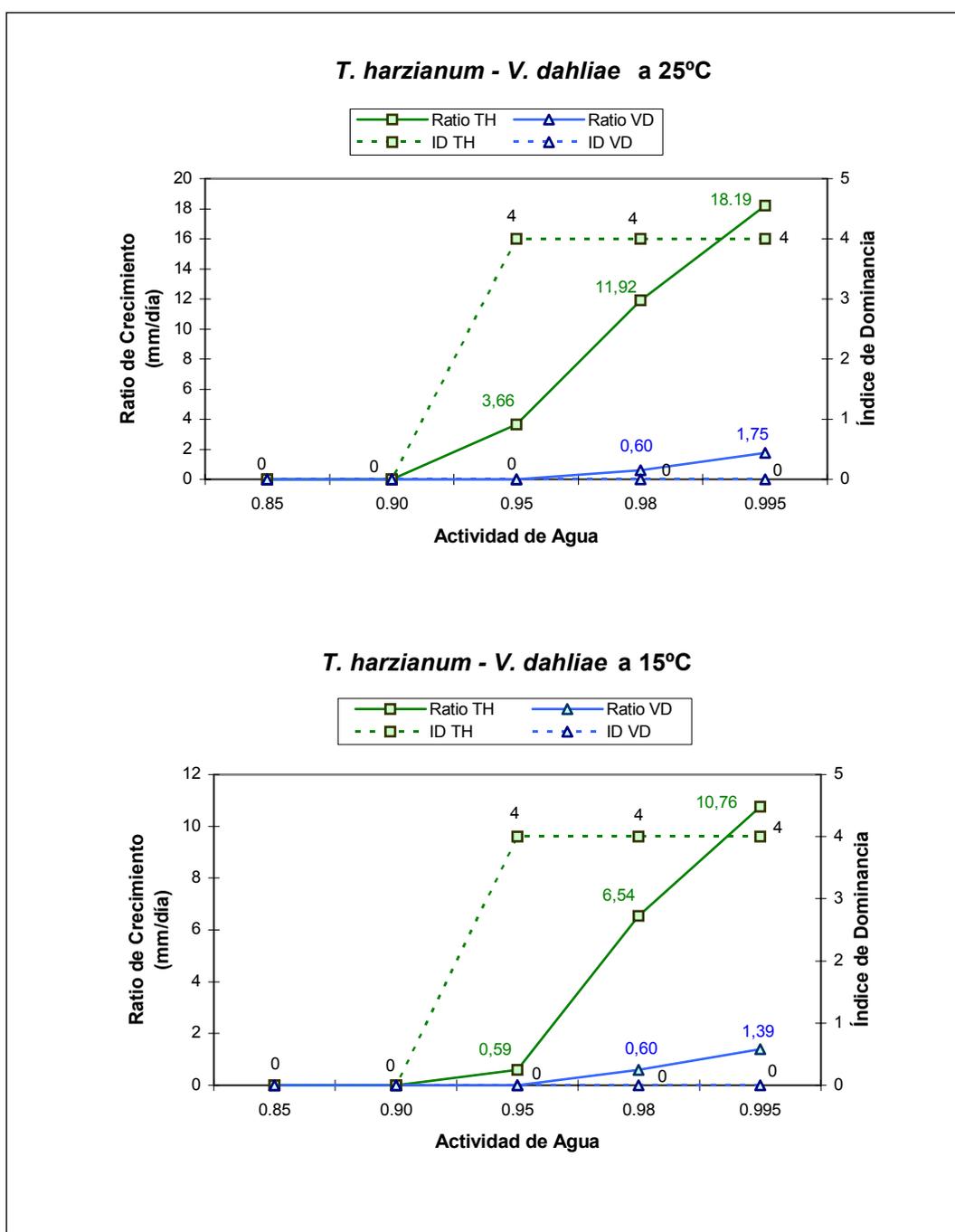


Figura 130: Relación entre la Ratio de Crecimiento y el I_D en la interacción TH-VD en función de la T.

Respecto a la cepa VD (Figura 130), e independientemente de la temperatura, la velocidad de crecimiento, también, aumenta al incrementarse la a_w de 0.98 a 0.995, pero los ratios a 15°C son ligeramente menores o iguales que cuando la temperatura era de 25°C.

El I_D para VD es nulo en todas las combinaciones de a_w y T, si bien para a_w altas esta cepa puede crecer. VD presenta I_D nulos, a 0.98 y 0.995 de a_w , debido a que la interacción que establece con TH es de Tipo D, dominancia por contacto, siendo TH la especie dominante de la interacción, por lo que el valor que se le asigna a VD es 0. Igualmente, presenta valor 0 en las a_w más bajas, entre 0.85 y 0.95, al no mostrar crecimiento en ellas. Todo esto sugiere que este hongo es fácilmente controlable por la cepa TH.

TH presenta valores de crecimiento mucho más grandes que VD en todas las condiciones en las que ambas cepas crecen en común, y esa dominancia se manifiesta con valores altos de I_D para TH, permitiéndole inhibir a su competidor.

En las imágenes de las Figuras 125 y 128 se observa el notorio predominio de TH sobre VD. El rápido desarrollo de TH y el escaso crecimiento de VD hacen posible que TH domine en toda la experiencia.

A la vista de los resultados podemos decir que TH es un hongo capaz de controlar a VD siempre que los factores ambientales de a_w sean superiores a 0.90.

Asimismo, estos resultados apoyan los estudios que sobre las especies del género *Verticillium* se han realizado, y ratifican el comportamiento antagónico de las especies de *Trichoderma*, en especial *T. harzianum*, referenciado por otros autores, frente *Verticillium dahliae* que causan daños importantes en los cultivos (Alstrom, 2000; Altomare y Bottalico, 1992; Georgieva, 1992; Gherbawy y Prillinger, 2000; Hanson, 2000; Huang, 2001; Kowalik, 1997; Kurzawinska y Pacyna, 2000; Martins y De Melo, 1998; Smith y col., 1992).

6. CONCLUSIONES

De los resultados “*in vitro*” del estudio individual de las cepas PO, TH, FOL 1 y 2, FOG 1 y 2, RS y VD, a las distintas actividades de agua (0.85, 0.90, 0.95, 0.98 y 0.995) y temperaturas (15 y 25°C) ensayadas, podemos concluir que:

- ✚ La cepa PO mostró crecimiento en todas las condiciones de a_w y T analizadas, alcanzando el máximo crecimiento a 25°C y 0.98 de a_w .
- ✚ La cepa TH, tanto a 15 como a 25°C, se desarrolló a las mismas a_w , siendo éstas las comprendidas entre 0.95 y 0.995, y presentó el óptimo de crecimiento a 0.995 de a_w y a 25°C.
- ✚ Las cuatro cepas de *Fusarium oxysporum*, crecieron en los mismos niveles de a_w . A 25°C entre 0.90 y 0.995, y a 15°C entre 0.95 y 0.995. En todas las cepas, el crecimiento máximo se registró cuando la a_w fue de 0.995 y la temperatura de 25°C.
- ✚ El perfil de desarrollo mostrado por las cepas RS y VD fue el mismo en las dos temperaturas, y crecieron cuando la disponibilidad de agua del medio fue elevada, a las a_w de 0.98 y 0.995, con óptimo de crecimiento a 25°C y para una a_w de 0.995.
- ✚ La cepa VD se caracterizó por presentar los valores de crecimiento más bajos de todas las cepas analizadas, por el contrario TH fue la que alcanzó mayores ratios de crecimiento.
- ✚ En las cepas TH, FOL 1 y 2, FOG 1 y 2, RS y VD se observó un incremento en las ratios de crecimiento al aumentar la disponibilidad de agua del medio, situándose el valor máximo de crecimiento cuando la a_w también fue máxima. Sin embargo, en la cepa PO, las ratios se incrementaron hasta 0.98 de a_w , pero posteriormente disminuyeron con el aumento de la a_w .

- ✚ En todas las cepas ensayadas, se observó una variación de las tasas de crecimiento con la temperatura, siendo la disminución de la misma la que ocasionó el descenso del crecimiento fúngico.
- ✚ Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) demostraron los efectos significativos ($P < 0.05$) que los factores simples a_w , T y su interacción ($a_w \times T$) tienen sobre el crecimiento medio de TH, RS, VD y FOG1, mientras que en las cepas PO, FOL 1 y 2, y FOG2 únicamente los factores simples fueron significativos ($P < 0.05$) en el crecimiento promedio de las mismas.

De los resultados “*in vitro*” del estudio de las interacciones fúngicas, a las distintas actividades de agua (0.85, 0.90, 0.95, 0.98 y 0.995) y temperaturas (15 y 25°C) ensayadas, podemos concluir que:

- ✚ La cepa PO creció a las mismas a_w , tanto en el estudio individual como en el dual, excepto a 15°C y para una a_w de 0.85 donde no mostró desarrollo al enfrentarse con FOL1 y FOL2.
- ✚ Las cuatro cepas de *Fusarium oxysporum* mostraron un perfil de desarrollo semejante en los dos ensayos, individual y dual. FOG1 fue la única que creció a 0.90 de a_w y 15°C.
- ✚ Las cepas TH, RS, FOL1 y VD mostraron la misma pauta de crecimiento tanto en el estudio individual y como en el dual, creciendo en las dos temperaturas a las mismas a_w .
- ✚ En general, todas las cepas presentaron mayores ratios de crecimiento cuando se estudiaron de forma individual que en cultivo dual. Sin embargo, PO y TH, de las que se evaluó su poder antifúngico, obtuvieron tasas de crecimiento más altas en los ensayos duales que en los individuales, coincidiendo con su óptimo de crecimiento.

- ✚ La cepa PO, en las interacciones con las cepas de *Fusarium oxysporum*, obtuvo tasas de crecimiento más altas cuando a 25°C la a_w fue igual o menor que 0.98.
- ✚ La cepa PO, a la temperatura de 15°C, fue capaz de superar el crecimiento de FOL1 y FOG1 si la a_w fue igual o menor que 0.95 y que 0.90, respectivamente. Sin embargo a 15°C y para una a_w de 0.95, no se apreciaron prácticamente diferencias en las ratios de crecimiento entre PO y FOL2, y PO y FOG2.
- ✚ La cepa TH cuando se enfrentó con RS y VD presentó siempre mayores ratios de crecimiento en todos los ensayos donde las cepas fueron capaces de crecer.
- ✚ La cepa TH, en la interacción con FOL1, obtuvo ratios de crecimiento más grandes en casi todas las condiciones ensayadas en las que mostraron crecimiento, excepto a la a_w de 0.95 y 15°C, donde no se observaron diferencias.
- ✚ Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) demostraron los efectos significativos ($P < 0.05$) que los factores simples a_w , T, especie fúngica (E), y sus interacciones dobles ($a_w \times T$, $a_w \times E$, $T \times E$) tienen sobre el crecimiento medio de las especies que componen las interacciones interespecíficas estudiadas. A excepción del factor E que no fue significativo ($P < 0.05$) en la interacción PO-FOL2 y PO-FOG 1 y 2, así como la interacción doble T x E en PO-FOL2.

De los resultados “*in vitro*” sobre el Tipo de Interacción e Índice de Dominancia en las interacciones fúngicas podemos concluir que:

- ✚ La cepa PO inhibió a distancia (Tipo E) y por contacto (Tipo D) el crecimiento de las cepas FOL 1 y 2, y FOG 1 y 2, siempre que la a_w fue menor o igual que 0.95, y posteriormente continuó creciendo sobre las colonias inhibidas, siendo en nuestro caso PO la especie dominante y, por tanto, obteniendo valores máximos, 5 y 4, de I_D .
- ✚ La cepa PO y las cepas *Fusarium oxysporum* mostraron, para una a_w igual o superior que 0.95, antagonismo mutuo a distancia (Tipo C) o por contacto (Tipo B), es decir, sin predominio de una especie sobre la otra.
- ✚ La cepa TH inhibió por contacto (Tipo D) el desarrollo de RS y VD en las condiciones de a_w y T en las que muestran crecimiento, y con crecimiento posterior de TH sobre las especies inhibidas, siendo, por tanto, la especie dominante de las interacciones, y registrando en esas condiciones valores altos de I_D , valor 4 en todas ellas.
- ✚ La cepa TH, en la interacción TH-FOL1, inhibió también por contacto (Tipo D) el crecimiento de FOL1 en la mayoría de las condiciones en las que las especies crecieron en común, excepto a 15°C y para una a_w de 0.95, donde se produce un antagonismo mutuo por contacto (Tipo B).

De todas las conclusiones anteriores se puede establecer, a modo de resumen, que:

- ✚ *Penicillium oxalicum* es un hongo que posee mayor habilidad para competir y dominar cuando las condiciones de a_w no son las óptimas para su crecimiento, siendo esta circunstancia la que le permitirá controlar a las cepas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* estudiadas, cuando la temperatura es de 25°C y las condiciones de a_w no superen el valor de 0.95.
- ✚ *Trichoderma harzianum* es capaz de controlar e inhibir el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* si las condiciones de a_w son mayores de 0.90 a 25°C y por encima de 0.95 a 15°C.
- ✚ Los ensayos realizados confirman que la cepa *Trichoderma harzianum* presenta una extraordinaria capacidad antagónica frente a *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahliae*.
- ✚ Por todo lo anteriormente expuesto, las cepas de *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma harzianum* aisladas, pueden ser considerados como buenos agentes de biocontrol, destacando por sus excelentes resultados la cepa *Trichoderma harzianum* estudiada frente a la de *Penicillium oxalicum*.

7.- PERSPECTIVAS DE FUTURO

Una vez llegado a este punto del trabajo y dado los buenos resultados obtenidos, queda abierto un camino en las investigaciones sobre el control biológico de las principales enfermedades y plagas que atacan a los cultivos, así como el estudio del espectro antagónico de las cepas *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma harzianum*, aisladas y estudiadas en este trabajo, ampliándose de este modo los posibles agentes patógenos a controlar. La UE tiene previsto, según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, que para el año 2010 desaparezcan del mercado alrededor de unos 50 productos químicos, por lo que si queremos que el control biológico sea una realidad, los estudios en este sentido deberán incrementarse y transferirse a la industria como alternativa a los plaguicidas convencionales para el control integrado de las enfermedades de los cultivos, y para ello ha de buscarse la formulación óptima del producto, y además que sea de fácil aplicación y distribución.

La línea que actualmente se desarrolla en el grupo de investigación, sobre las cepas *Penicillium oxalicum* LBVB 1001 y *Trichoderma harzianum* LBVB 1010, centra la mayoría de los esfuerzos en investigación: por una parte se ha puesto en marcha la fase de patente de ambas cepas; por otra, existe un sólido interés, por parte de empresas privadas, para la transferencia de estos resultados al campo comercial. Este interés se suscitó fruto de que el trabajo “*Trichoderma harzianum*: una solución a las enfermedades ocasionadas por *Verticillium* y *Rhizoctonia*” presentado en las 25^{as} Jornadas de Productos Fitosanitarios, fuera galardonado con el Premio Jornadas Fitosanitarias en su tercera edición, siendo las entidades organizadoras del certamen la Universidad Ramón Llull a través del Institut Químic de Sarrià, en colaboración con el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, el Departament d’Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya, la Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas (AEPLA), y el Colegio Oficial de Ingenieros Agrónomos de Cataluña. Los excelentes resultados obtenidos de los estudios “*in vitro*” de la cepa *Trichoderma harzianum* nos permitió contactar con diversas empresas, que tienen ya patentados y comercializados distintos microorganismos como agentes de biocontrol. El

siguiente objetivo a cumplir, en este sentido, es la firma de contratos y convenios de I+D que permitan una estabilidad y continuidad de esta línea de investigación.

Adicionalmente, en un futuro próximo se ha planteado realizar los siguientes estudios con las cepas *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma harzianum*:

1. Evaluación de la capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma harzianum* frente a los agentes fitopatógenos estudiados en condiciones de campo.
2. Purificación e identificación de los metabolitos activos de *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma harzianum*, determinación de las estructuras químicas (compuestos activos) de los mismos.
3. Formulación de los hongos y/o principios activos de los mismos para su uso de modo comercial.
4. Conocer el espectro de acción de *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma harzianum*, ampliando los estudios a otros agentes fitopatógenos.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- Abbattista Gentile I, Ferraris L, Matta A. 1988. Variations of phenoloxidase activities as a consequence of stresses that induce resistance to *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Phytopathology* 122: 45-53.
- Agrios GN. 1999. *Fitopatología*. Ed. Limusa. México.
- Amadioha AC. 1999. Control of tomato wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*) with solarization and methyl bromide or *Trichoderma harzianum*. Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. Environment Protection Agency (EPA). Washington.
- Antal Z, Manczinger L, Szakacs G, Tengerdy RP, Ferenczy L. 2000. Colony growth, in vitro antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. *Mycological Research* 104 (5): 545-549.
- Aparicio-Salmerón V, Rodríguez MD, Gómez V, Sáez E, Belda JE, Casado E, Lastres J. 1991. Plagas y enfermedades del tomate en la provincia de Almería: Control racional. Conserjería de Agricultura y Pesca. Dir. General de Investigación Agraria. Comunicación I+D Agroalimentaria nº 12/95.
- Alfonso C, Del Amo F, Nuero OM, Reyes F. 1992. Physiological and biochemical studies on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 for its control by non-pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters* 99: 169-74.
- Alstrom S. 2000. Root colonizing fungi from oilseed rape and their inhibition of *Verticillium dahliae*. *Journal of Phytopathology* 148 (7-8): 417-423.
- Altomare C, Bottalico A. 1992. A toxicological approach to the biocontrol of plant pathogens by *Trichoderma*. *Bulletin OILB/SROP* 15: 88-90.
- Ayerst G. 1969. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *J. Stored Prod. Res.* 5: 127-141.
- Bari MA, Rahman ML, Mian IH. 2000. Biological control of potato black scurf disease through fungal antagonist. *Bangladesh Journal of Plant Pathology* 16: 1-2, 5-7.
- Baird RE, Huber DM, Mullinix BG. 1996. The mycobiota from seeds shrunken2 (sh2) sweet corn. *Mycopathologia* 132 (3): 147-154.
- Baker KF, Cook RJ. 1974. *Biological control of plant pathogens*. W. H. Freeman. San Francisco.
- Bishop CD, Cooper RM. 1983. An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiological Plant Pathology* 22: 15-27.

- Biswas KK. 1999. Screening of isolates of *Trichoderma harzianum* Rifai for their relative biocontrol efficacy against *Fusarium oxysporum* f.sp. *udum* and *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annals of Plant Protection Sciences* 7 (2): 125-130.
- Bodo B, Rebuffat S, Hajji ME, Davous D. 1985. Structure of trichorzianine A IIIc, an antifungal peptide from *Trichoderma harzianum*. *J. Amer. Chem. Soc.* 107: 6011-6017.
- Booth C. 1971. The genus *Fuarium*. Key, Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Bruce A, Srinivasan V, Staines HJ, Highley TL. 1995. Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungi. *Int Biodet Biodeg* 35: 337-353.
- Bunker RN, Mathur K. 2001. Antagonism of local biocontrol agents to *Rhizoctonia solani* inciting dry root of chilli. *Journal of Mycoloy and Plant Pathology* 31 (1): 50-53.
- Butt TM, Harris JG, Powell DA. 1999. Microbial pesticides. En: *Biopesticides. Use and delivery*. Hall FR, Menn JJ (Eds). Humana Press. Totowa. New Jersey. pp 23-43.
- Callan NW, Miller JB, Mathre DE, Mohan SK. 1996. Soil moisture and temperature effects on shrunken2 sweet corn seed decay and seedling caused by *Penicillium oxalicum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121 (1): 83-90.
- Camporota P. 1985. Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Agronomie* 5: 613-620.
- Canessa EA, Morell JJ. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on induction of laccase by *Trametes versicolor* on ponderosa pine sapwood. Document International Research Group on Wood Preservation. Stockholm: IRG Secretariat.
- Carlile M, Watkinson S. 1997. *The fungi*. Academic Press. London.
- Cherif M, Benhamou N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 80: 1406-1414.
- Chet I. 1987. *Trichoderma*: Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. En: *Inovative Approaches to Plant Disease Control*. Chet I. (Ed.). John Wiley & Sons. New York. pp 137-160.
- Claydon N, Allan M, Hanson JR, Avent AG. 1987. Antifungal alkaly pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 88 (4): 502-513.

- Claydon N, Hanson JR, Truneh A, Avent AG. 1991. Harzianolide, a butenolide metabolite from cultures of *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry* 30 (11): 3802-3803.
- Companys E. 1996. Influència de la activitat d'aigua i la temperatura en el creixement i la interacció de soques de fongs aïllades de panís. Projecte Final de Carrera. ETSEAL. Universitat de Lleida.
- Cook RJ, Baker KF. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. USA.
- Cooke RC, Whipps JM. 1993. Ecophysiology of fungi. University Press. Cambridge
- Corley DG, Miller-Widemann M, Durley RC. 1994. Isolation and structure of harzianum A: a new trichothecene from *Trichoderma harzianum*. *J. Natural Products* 57 (3): 422-425.
- Correa-Victoria F. 1993. Alternativas para el manejo del añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani*. *Arroz* 41: 32-37.
- Dal Bello GM, Monaco CI, Chaves AR. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo. *Rev Iberoam Micol* 14: 131-134.
- Damicone J, Patel M, Moore W. 1993. Density of sclerotia of *Rhizoctonia solani* and incidence of sheath blight in rice fields in Mississippi. *Plant Disease* 77: 257-260.
- Das BC, Hazarika DK. 2000. Biological management of sheath blight of rice. *Indian Phytopathology* 53 (4): 433-435.
- Davis D. 1968. Partial control of *Fusarium* wilt in tomato by formae *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 58: 121-122.
- Deacon JW. 1983. Microbial control of plant pest and diseases. Van Nostrand Reinbold (UK). Co. Ltd.
- De Cal A, Pascual S, Larena I, Melgarejo P. 1995. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Pathology* 44 (5): 909-917.
- De Cal A, Pascual S, Melgarejo P. 1997 a. Involvement of resistance induction by *Penicillium oxalicum* in the biocontrol of tomato wilt. *Plant pathology* 46 (1): 72-79.
- De Cal A, Pascual S, Melgarejo P. 1997 b. A rapid laboratory method for assessing the biological control potential of *Penicillium oxalicum* against *Fusarium* wilt of tomato. *Plant pathology* 46 (5): 699-707.

- De Cal A, García Lepe R, Pascual S, Melgarejo P. 1999. Effects of timing and method of application of *Penicillium oxalicum* on efficacy and duration of control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Pathology* 48: 260-266.
- De Cal A, García Lepe R, Melgarejo P. 2000. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: histological studies of infected and induced tomato stems. *Phytopathology* 90 (3): 260-268.
- De Cal A, Melgarejo P. 2001. Repeated applications of *Penicillium oxalicum* prolongs biocontrol of *Fusarium* wilt of tomato plants. *European Journal of Plant Pathology* 107 (8): 805-811.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH. 1980. Compendium of soil fungi. Vol. 2. Academic Press. London.
- Dreyfuss M, Härrí E, Hofmann H, Kobel H, Pache W, Tschertter H. 1976. Cyclosporin A and C, new metabolites from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai. *European J. Appl. Microbiol.* 3: 125-133.
- Droby S, Cohen L, Daus A, Weis B, Horev B, Chalutze E, Katz H, Keren-Tzur M, Shachanai A. 1998. Comercial testing of aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol. Control* 12: 97-101.
- Ebben MH, Spencer DM. 1979. The use of antagonistic organisms for the control of black root rot of cucumber *Phomopsis sclerotioides*. *Annals of Applied Biology* 89: 103-106.
- Elad Y, Sadowsky S, Chet I. 1987. Scanning electron microscopical observations of early stages of interaction of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88: 259-263.
- Estévez de Jensen C, Percich JA, Graham PH. 2002. Integrated management strategies of bean root with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. *Field Crops Research* 74 (2-3): 107-115.
- Fernández-Larrea O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* 62: 96-100.
- Fravel DR. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 75-91.
- Frisvad JC, Samson RA. 1991. Filamentous fungi in foods and feeds: Ecology, spoilage and mycotoxin production. En: *Handbook of applied mycology*. Vol. 3. Foods and feeds. Arora, D. A., Mukerji, D. K., Marth, E. H. (Eds.). Marcel Dekker. New York. pp 31-68.
- Fuchs J, Défago G. 1991. Protection of tomatoes against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by combining a non-pathogenic *Fusarium* with different bacteria in

- untreated soil. En: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Progress and Prospects. Keel C, Koller B, Défago G (Eds.). IOBC/WPRS. pp 51-56.
- Fujiwara A, Okudu T, Masuda S, Shiomi S, Miyamoto C, Sekine Y, Tazoe M, Fujiwara M. 1982. Fermentation, isolation and characterization of isonitrile antibiotics. *Agric. Biol. Chem.* 46 (7): 1803-1809.
- García Breijo FJ, Hinojosa A, Real MC, Santamarina MP. 2001. Estudio de la actividad bactericida y fungicida de los metabolitos del hongo *Penicillium oxalicum* Currie and Thom. *Phytoma* 132: 134-137.
- García Lepe R, Rodríguez P, De Cal A, García Olmedo F, Melgarejo P, Duffy B (Ed.), Rosenberger U (Ed.), Defago G. 1998. Induced resistance against *Fusarium* wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* is not associated to patogenesis related proteins. *Bulletin OILB/SROP* 21(9): 123-127.
- Giménez A, García Breijo FJ, Roselló J, Santamarina MP. 2000. Investigación y detección de metabolitos fúngicos con actividad bactericida, fungicida e insecticida. *Phytoma* 121: 132-135
- Georgieva O. 1992. Antagonist characteristics of *Trichoderma koningii* towards *Verticillium dahliae* on pepper. *Bulletin OILB/SROP* 15: 18-20.
- Geeta S, Saxena SC, Sharma G. 2001. Evaluation of biocontrol agents against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of banded leaf and sheath blight of maize. *Annals of Plant Protection Sciences* 9 (1):144-145.
- Gherbawy Y, Prillinger H. 2000. Root mycoflora of pepper (*Capsicum annuum*) antagonistic to *Verticillium dahliae*. *Czech Mycology* 52 (3): 219-226.
- Ghisalberti EL, Hackless DC, Rowland C, White AH. 1992. Harziandione, a new class of diterpene from *Trichoderma harzianum*. *J. Natural Products* 55 (11): 1690-1694.
- Godwin-Egein MI, Arinzae AE. 2001. Antagonism between *Trichoderma harzianum* Rifai and *Fusarium oxysporum* Schlecht emend Sny and Hans. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 31 (1): 22-30.
- Griffin DM. 1981. Water and microbial stress. En: *Advances in Microbiol Ecology*, 5. Alexander M (Ed). Plenum Publishing Corporation. London. pp 91-139.
- Hadar Y, Chet I, Henis Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 69: 64-68.
- Hamed HA. 1999. Biological control of basal stem rot wilt of cucumber caused by *Pythium ultimum* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*. *African Journal of Mycology and Biotechnology* 7 (1): 81-91.

- Hanson LE. 2000. Reduction of *Verticillium* wilt symptoms in cotton following seed treatment with *Trichoderma virens*. *Journal of Cotton Science* 4 (4): 224-231.
- Harman GE, Backman PA, Turner JT, Fillatti T, McCall C, Comai L, Kiser J, Stalker D, Foudin AS, Shantharam S. 1989. Symposium: biocontrol and biotechnological methods for controlling cotton pests. En: *Proceedings of the Beltwide cotton production research conferences*. Brown JM, Richter DA (Eds). Memphis. Tennessee. USA. pp 15-20.
- Hassanein AM, El Barougy E, Elgarhy AM, Parikka P, El Sharkawy TA. 2000. Biological control of damping-off, root-rot/wilt disease of alfalfa in Egypt. *Egyptian Journal of Agricultural Research* 78 (1): 63-71.
- Hervas A, Landa B, Datnoff LE, Jiménez-Díaz RM. 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms of *Fusarium* wilt development in chickpea. *Biological Control* 13 (3): 166-176.
- Hill R A. 1979. Barley grain microflora with special reference to *Penicillium* species. En: *Effect of water activity, temperature and substrate on interaction between field and storage fungi*. Magan N, Lacey J. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 82: 83-93.
- Hocking AD, Pitt JI. 1979. Water relations of some *Penicillium* species at 25°C. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 73: 141-145.
- Huang JW, Kuhlman EG. 1991. Formulation of a soil amendment to control damping-off of slash pine seedlings. *Phytopathology* 81: 163-170.
- Huang J. 2001. Biocontrol and growth promotion with cold tolerant *Trichoderma*. *IPM Practitioner* 23 (2): 1-6.
- Ikotun T. 1984. Cell wall-degrading enzymes produced by *Penicillium oxalicum* Currie and Thom. *Mycopathologia* 88: 15-21.
- Inglis GD, Kawchuk LM. 2002. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 48 (1): 60-70.
- Janisiewicz WJ, Jeffers SN. 1997. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and a gray mold of apples in cold storage. *Crop Protection* 16: 629-633.
- Jarvis W. 1998. *Control de las enfermedades en cultivos de invernadero*. Ediciones Mundi Prensa. Madrid.
- Jijakly MH, Lepoivre P. 1995. Use of biological pesticides for the protection of apples in storage. *Fruit Belge* 63: 83-88.

- Karunanithi K, Usman KM. 1999. Screening of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesami* causing wilt in sesamum. *Crop Research Hisar* 18 (1): 127-130.
- Kowalik M. 1997. *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. as factors controlling the occurrence of pathogenic fungi in stands of a mixture of alfalfa and grasses. *Progress in Plant Protection* 37 (2): 390-393.
- Kurzawinska H, Pacyna E. 2000. Fungi isolated from substrate of tomato plants and their effect on the growth of two tomato pathogens. *Phytopathologia Polonica* 20: 115-121.
- Lacey J, Magan N. 1991. Fungi relationships in cereal grains: their occurrence and water and temperature. En: *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Chelkowski J (Ed.). Elsevier. Amsterdam. pp 77-118.
- Larena I, Melgarejo P, De Cal A. 2002. Production, survival, and evaluation of solid substrate inocula of *Penicillium oxalicum*, a biocontrol agent against *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology* 92 (8): 863-869.
- Larkin RP, Fravel DR. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Disease* 82 (9): 1022-1028.
- Lartey RT, Curl EA, Peterson CM. 1994. Interactions of mycophagous collembolan and biological control fungi in the suppression of *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1-88.
- Latorre BA, Agosin E, Sanmartín R, Vasquez GS. 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis bunch* rot of table grape in Chile. *Crop Protection* 16 (3): 209-214.
- Latunde AO. 1991. The use of *Trichoderma koningii* in the control of web blight disease caused by *Rhizoctonia solani* in the foliage of cowpea (*Vigna unguiculata*). *J. Phytopathology* 133: 247-254.
- Lee F, Rush M. 1983. Rice sheath blight: a major rice disease. *Plant Disease* 67: 829-832.
- Lemanceau P, Alabouvette C. 1993. Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent Pseudomonads: mechanisms and applications. *Biocontrol Science and Technology* 3: 219-234.
- Lewis JA, Papavizas GC. 1991. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. *Crop Protection* 10: 95-105.
- Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Tronsmo A, Woo SL, Di Pietro A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal

- activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- Mace ME, Bell AA, Beckman CH (Eds.). 1981. Fungal wilt diseases of plants. Academic Press. New York.
- Magan N, Lacey J. 1984. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 82: 83-93.
- Marchetti R, Nipoti P, Ercole ND, Guerzoni ME. 1992. Competition at atmospheric level as biocontrol mechanism in *Trichoderma* spp. *Oetria* 2: 137-147.
- Marois JJ, Mitchell DJ. 1981 a. Effects of fumigation and fungal antagonists on the relationships of inoculum density to infection incidence and disease severity in *Fusarium* crown rot of tomato. *Phytopathology* 71:167-170.
- Marois JJ, Mitchell DJ. 1981 b. Effects of fungal communities on the pathogenic and saprophytic activities of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 71: 1251-1256.
- Marois JJ, Mitchell DJ, Sonoda RM. 1981 c. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato under field conditions. *Phytopathology* 71: 1257-1260.
- Marois JJ, Mitchell DJ, Papavizas GC. 1984. Ability of *Talaromyces flavus* to occupy rhizosphere and its interaction with *Verticillium dahliae*. *Soil Biology and Biochemistry* 16: 387-390.
- Marín S. 1994. Influencia de los factores abióticos sobre el crecimiento y producción de fumonisinas por *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium subglutinans* en maíz. ETSEAL. Universitat de Lleida.
- Marín S. 1995. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Can. J. Microbiol.* 41: 1063-1070.
- Marín S, Companys E, Sanchis V, Ramos AJ, Magan N. 1998 a. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. *Mycol. Res.* 120 (8): 959-964.
- Marín S, Sanchis V, Ramos AJ, Viñas I, Magan N. 1998 b. Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycol. Res.* 102 (7): 831-837.
- Martins MP, De Melo IS. 1998. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against *Verticillium dahliae* Kleb. *Scientia Agricola* 55 (1): 1-7.

- Mishra PK, Mukhopadhyay AN, Fox TRV. 2000. Integrated and biological control of gladiolus corm rot and wilt caused *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. *Annals of Applied Biology* 137 (3): 361-364.
- Montealegre J, Henríquez J. 1990. Posibilidades de control integrado de *Sclerotium rolfsii* Sacc, mediante hongos del género *Trichoderma* y fungicidas. *Fisiopatología* 26: 68-74.
- Mossel DAA. 1985. *Microbiología de los Alimentos*. Acriba. Zaragoza.
- Niknejad-Kazempour M, Sharifi-Tehrani A, Okhovat M. 2000. Effect of antagonistic fungi *Trichoderma* spp. on the control of *Fusarium* wilt of tomato caused *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* under greenhouse conditions. *Iranian Journal of Agricultural Sciences* 31 (1): 31-37.
- Orentlich A, Wiesman Z, Gottlieb HE, Cojocarú M, Chet I. 1992. Inhibitory furanone produced by the control agent *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry* 31: 485-486.
- Ou S. 1985. *Rice disease*. Commonwealth Mycological Institute. Lew. England.
- Ownley B, Benson DM. 1987. Biological control of *Phytophthora* root rot of azalea with *Penicillium oxalicum*. *Phytopathology* 77: 1688.
- Pandey PR, Arora DK, Dubey RC. 1993. Antagonistic interactions between fungal pathogen and phylloplane fungi of guava. *Mycopathologia* 124: 31-39.
- Pandey KK, Upadhyay JP. 1999. Comparative study of chemical, biological and integrated approach for management of *Fusarium* wilt of pigeonpea. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 29 (2): 214-216.
- Pandey KK, Upadhyay JP. 2000. Microbial population from rhizosphere and non-rhizosphere soil of pigeonpea: screening for resident antagonist and mode of mycoparasitism. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 30 (1): 7-10.
- Pantoja A, Fisher A, Correa-Victoria F, Sanint, L, Ramírez A. 1997. MIP en arroz. Manejo integrado de plagas: artrópodos, enfermedades y malezas. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali. Colombia.
- Papavizas GC, Lewis JA. 1981. Induction of new biotypes of *Trichoderma harzianum* resistant to benomyl and other fungicides. *Phytopathology* 71: 247-248.
- Papavizas GC, Lewis JA, Abd-El Moity TH. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 126-132.
- Papavizas GC. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 23-54.

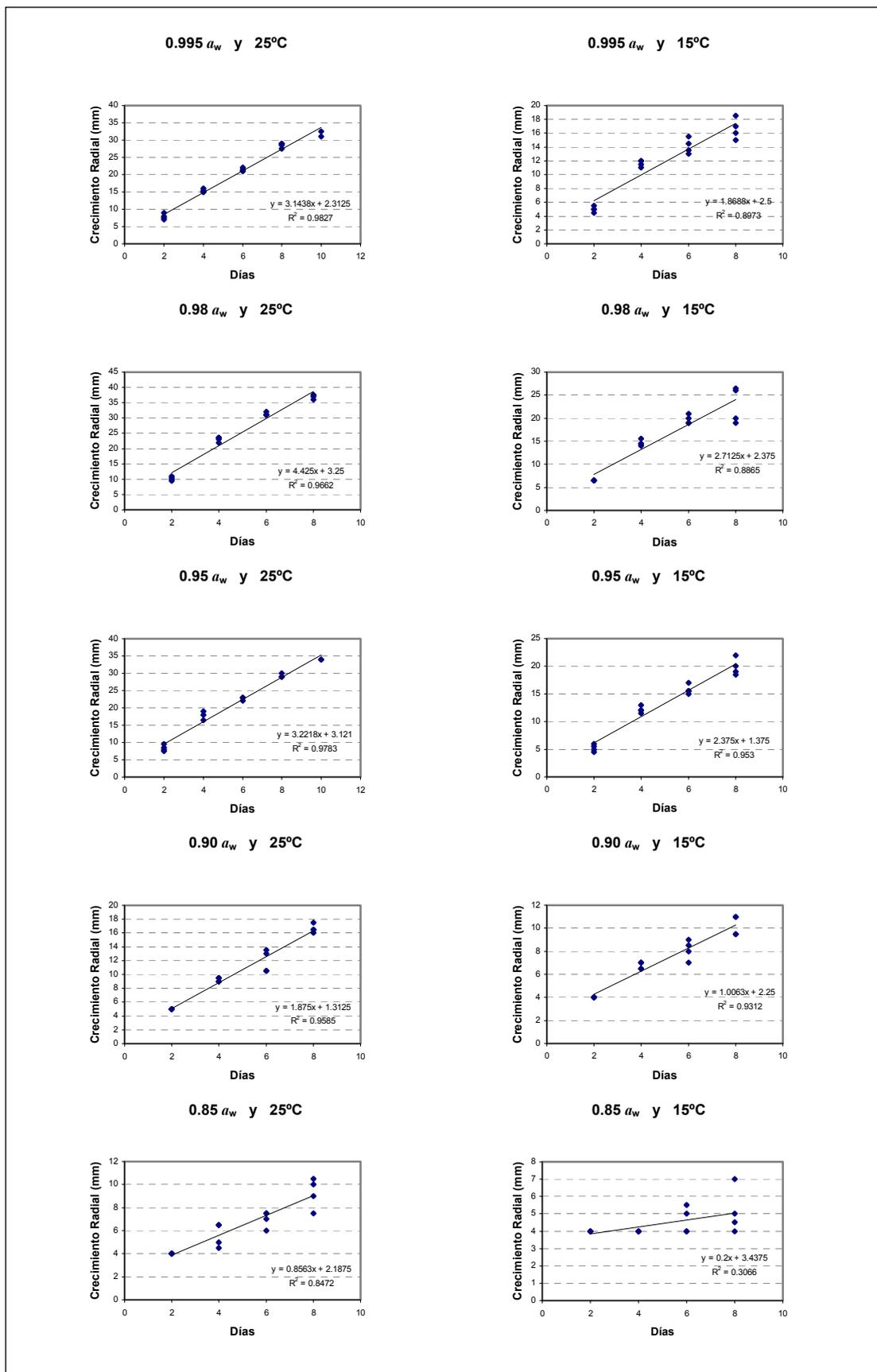
- Pascual S, Rico JR, De Cal A, Melgarejo P. 1997. Ecophysiological factors affecting growth, sporulation and survival of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum*. *Mycopathologia* 139: 43-50.
- Pascual S, De Cal A, Magan N, Melgarejo P. 2000. Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged culture. *Journal of Applied Microbiology* 89 (5): 847-853.
- Patricio FRA, Kimati H, Barros BC. 2001. Selection of *Trichoderma* spp. isolates antagonistic to *Pythium aphanidermatum* and *Rhizoctonia solani*. *Summa Phytopathologica* 27 (2): 223-229.
- Pelhate J. 1968. Determination of water requirements in grain storage fungi. *Mycopath. Mycol. Appl.* 36: 117-128.
- Pérez-Leblic MI, Reyes F, Lahoz R. 1982. Autolysis of *Penicillium oxalicum* with special reference to its cell walls. *Can J Microbiol* 28: 1289-1295.
- Pinzón L, Salgado R, Martínez López G. 1999. Antagonism between different isolates of *Trichoderma* spp. and *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (Pril. & Del.) Snyd. & Hans. *Fitopatología colombiana* 23 (1-2): 7-11.
- Pitt JI. 1979. The Genus *Penicillium* and Its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talatomyces*. Academic Press. London.
- Pitt JI, Hocking AD. 1999. Fungi and food spoilage. Aspen Publishers. United Kingdom.
- Pushpavathi B, Sarwar HAK, Raof MA, Babu RR. 1998. Management of wilt disease in castor. *Indian Journal of Plant Protection* 26 (2): 177-180.
- Quinlon RJ. 1988. Use of fungi to control insects in glasshouses. En: *Fungi in Biological Control Systems*. Burge, M. N. Manchester University Press. pp 88-210.
- Rajeev-Pant R, Mukhopadhyay AN. 2001. Integrated management of seed and seedling rot complex of soybean. *Indian Phytopathology* 54 (3): 346-350.
- Rajendran K, Ranganathan K. 1996. Biological control of onion basal rot (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*) by combined application of fungal and bacterial antagonists. *Journal of Biological Control* 10 (1-2): 97-102.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. 1999. Fungi. En: *Biology of plants*. 6th ed. Ed. Freeman and Company. Worth Publishers. pp 306-346.

- Rhodes DJ. 1993. Formulation of biological control agents. En: Exploitation of microorganisms. Jones DG (Ed.). Chapman & Hall. London. pp 411-439.
- Riisom T, Jakobsen H, Rastrub-Andersen J, Lorek H. 1987. A ^{13}C NMR study on *Trichoderma* in spectral assignments, spin-lattice relaxation and biosynthetic incorporation of sodium (1- ^{13}C)-acetate. Acta Chem. Scand. B 32: 499-505.
- Rifai MA. 1969. A revision of genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116: 1-56.
- Rodríguez H, Nass H, Cardona R, Alemán L. 1999. Alternativas para controlar el añublo de la vaina foliar *Rhizoctonia solani* en arroz. Fitopatol. Venez. 12: 18-21.
- Rodríguez H, Cardona R, Arteaga L, Alemán L. 2001. Control químico del añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani* Kuhn en arroz. Bioagro 13 (1): 32-38.
- Romero R, Zúnica LS. 1994. Estadística. Servicio de Publicaciones de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.
- Sabet KK, Mostafa MA, El Said SI, El Gamal NG. 2000. Biological and chemical control of root diseases of tomato plants. Proceeding The BCPC Pests and diseases Vol. 3. British Crop Protection Council. Farnham. UK. pp 1043-1408.
- Sáenz R. 1996. Influencia de la actividad del agua y de la temperatura sobre la germinación y el crecimiento de seis cepas de hongos de almacén. ETSEAL. Universitat de Lleida.
- Samaniego JA, Gámez IA. 2000. Evaluation of residues to maintain the health of seeds inoculated with *Trichoderma* sp. in soil infested with *Rhizoctonia solani*. Revista Mexicana de Fitopatología 18 (2): 71-78.
- Samson R, Hoekstra E, Frisvad J, Filtenborg O (Eds). 2000. Introduction to food-and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht.
- Sandoval I, Sáenz M. 1992. Estudio preliminar del biocontrol de *Phytophthora nicotianae* y *Rhizoctonia solani* en tabaco mediante *Trichoderma* spp. Resúmenes Biotecnología Habana. La Habana.
- Sandoval I, López MO, García D, Mendoza I. 1994. *Trichoderma harzianum* (cepa A-34): un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y pimiento. Resúmenes IX Forum de Ciencia y Técnica; II Encuentro Nacional de Bioplaguicidas; II Expo-CREE. INISAV. pp 73-74.
- Sanjav A, Kaushik JC. 2001. Efficacy of *Trichoderma* species and *Gliocladium virens* as biocontrol agents against damping-off of forest nurseries. Plant Disease Research 16 (1): 46-51.

- Santamarina MP, Jiménez M, Sanchis V, García F, Hernández E. 1987. A strain of *Penicillium funiculosum* Thom with activity against *Panonychus ulmi* Toth (Acar. Tetranychida). *J. Appl. Ent.* 103: 471-476.
- Santamarina MP, Sanz I, Roselló J, Vañó J. 2000. Detección y aislamiento de metabolitos del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai con actividad bactericida y funguicida. *Phytoma España* 122: 55-58.
- Santamarina MP, Sanz I, Roselló J, García Breijo FJ. 2001. Una cepa de *Trichoderma harzianum* con un fuerte potencial para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos y hongos productores de micotoxinas. Resúmenes del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología.
- Santamarina MP, Roselló J, Llacer R, Sanchis V. 2002 a. Antagonistic activity of *Penicillium oxalicum* Currie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum* Rifai isolates against fungi, bacteria and insects in vitro. *Rev Iberoam Micol* 19: 99-103.
- Santamarina MP, Serna R, Asensi C, Roselló J. 2002 b. Evolución de la micoflora del arroz durante el periodo de almacenamiento. *Phytoma* 142: 113-117.
- Santamarina MP, Roselló J, Serna R. 2002 c. Estudio comparativo de la micoflora del arroz. *Rev Iberoam Micol* 19: S28.
- Sarhan MM, Ezzat SM, Tohamy MRA, El Essawy AEFA, Abd-Allah ESF. 2000. Application of *Trichoderma hamatum* as a biocontroller against tomato wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Egyptian Journal of Microbiology* 34 (2): 347-376.
- Scott WJ. 1957. Water relations of spoilage microorganisms. *Advances in Food Research* 7: 83-127.
- Sharma BK. 1998. Antifungal properties of biocontrol agents and plant extracts against causal fungi of yellows and rhizome rot of ginger. *Journal of Biological Control* 12 (1): 77-80.
- Sivan A, Chet I. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 675-682.
- Smith IM, Dunez J, Lelliott RA, Phillips DH, Archer SA. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Ed. Mundi Prensa. Madrid.
- Srivastava AK, Singh RK. 2000. Extent of lysis of *Rhizoctonia solani* Kuhn cell wall preparation by different hyperparasites. *Journal of Mycopathological Research* 38 (2): 129-131.
- Stefanova M, Sandoval I. 1995. Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp. en el control de hongos fitopatógenos de suelo. INISAV. Boletín Técnico 2: 1-22.

- Stirmanova NI. 1994. New commercial forms of fungal preparations. *Zashchita Rastenii* Moskva, 9: 7-8.
- Sudhakar R, Rao KC, Reddy CS. 1998. Studies on antagonism of *Trichoderma* and *Gliocladium* species against *Rhizoctonia solani* of rice. *Indian Journal of Plant Protection* 26 (1): 25-29.
- Sugiyama M. 1988. Integrated pest management in rice. *Expt. Agric.*: 115-137.
- Tamietti G, Ferraris L, Matta A, Abbattista Gentile I. 1993. Physiological responses of tomato plants grown in *Fusarium* suppressive soil. *Journal of Phytopathology* 138: 66-76.
- Thrane C, Tronsmo A, Jensen DF. 1997. Endo-1,3-beta-glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum* purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. *European Journal of Plant Pathology* 103 (4): 331-344.
- Tronsmo A. 1996. *Trichoderma harzianum* in biological control of fungal disease. En: *Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens*. Hall R (Ed.). The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. USA. pp 213-236.
- Van den Boogert PHJ. 1999. Mycoparasitism and biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Summa Phytopathologica* 25: 107-110.
- Wainwright M. 1995. *Introducción a la biotecnología de los hongos*. Editorial Acriba S.A. Zaragoza.
- Weber Z, Werner M, Fruzynska-Jozwiak D. 1998. Biological protection of carnation, asparagus and babies-breath against different formae speciales of *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Phytopathologia Polonica* 16: 37-43.
- Weber Z, Grajek W, Werner M, Fruzynska-Jozwiak D. 2000. Influence of *Trichoderma viride* (85/1) and *Trichoderma harzianum* (658) on the growth of three plant species and their control effect against particular isolates of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathologia Polonica* 19: 107-115.
- Webster R, Gunnell P. 1992. *Compendium of Rice Disease*. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. USA.
- Windels CE, Kommedahl T. 1978. Factors affecting *Penicillium oxalicum* as a seed protectant against seedling blight of pea. *Phytopathology* 68: 1656-1661.
- Windels CE, Kommedahl T. 1982. Pea cultivar effect on seed treatment with *Penicillium oxalicum* in the field. *Phytopathology* 72: 541-543.

- Yamaguchi I. 1992. Natural products as agrochemical and leads. Extended Summary Sci Pesticide. Group Symposium. Novel approaches in agrochemical research III. Pestic. Sci 35: 391-392.
- Ye YJ, Liu WS, Qun WL. 1995. Identification of the causal organisms of sorghum premature death or ripening in China. International Sorghum and Millets Newsletter 36: 78-79.

Figura A-1: Crecimiento de PO en PDA a diferentes T y a_w .

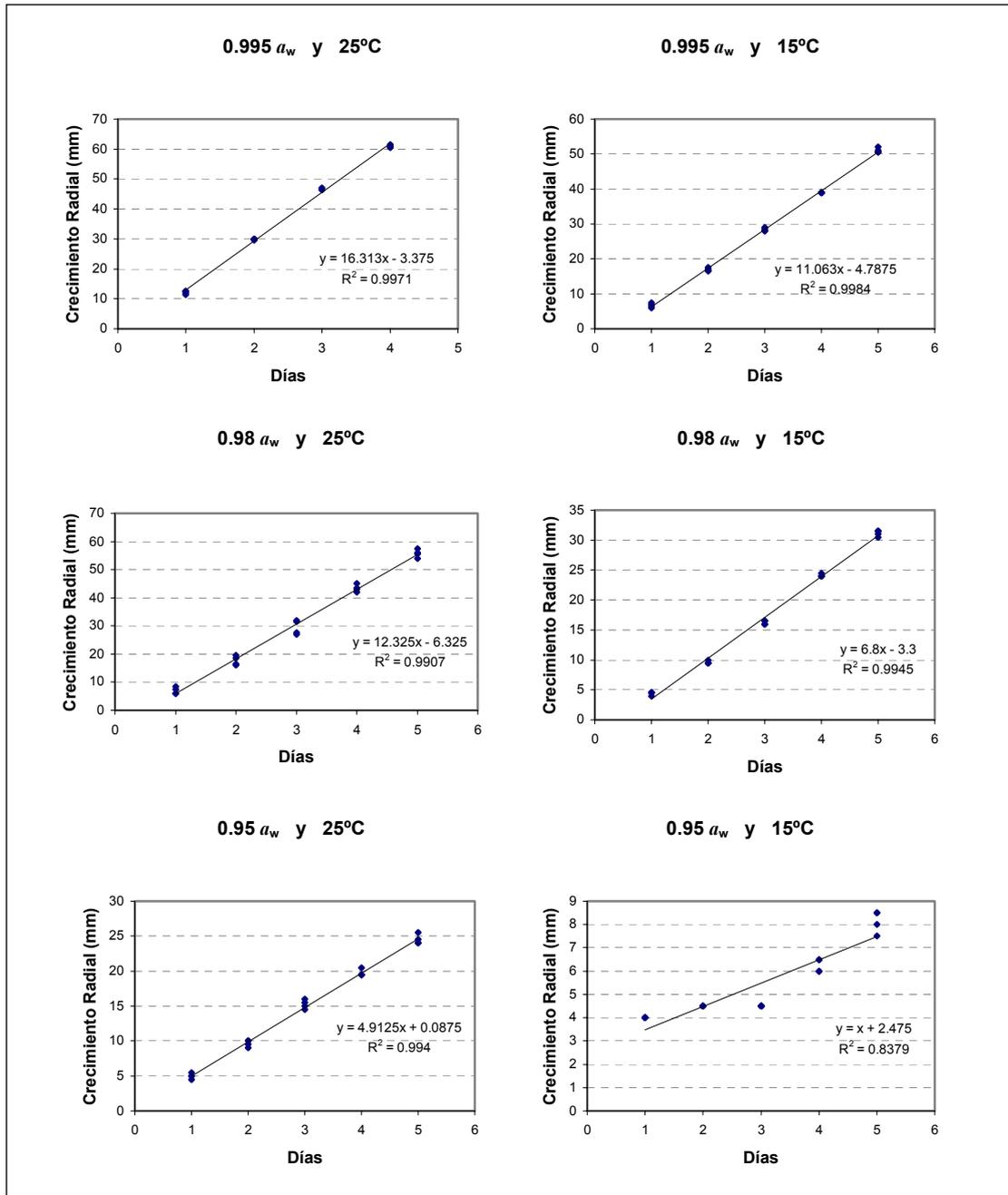
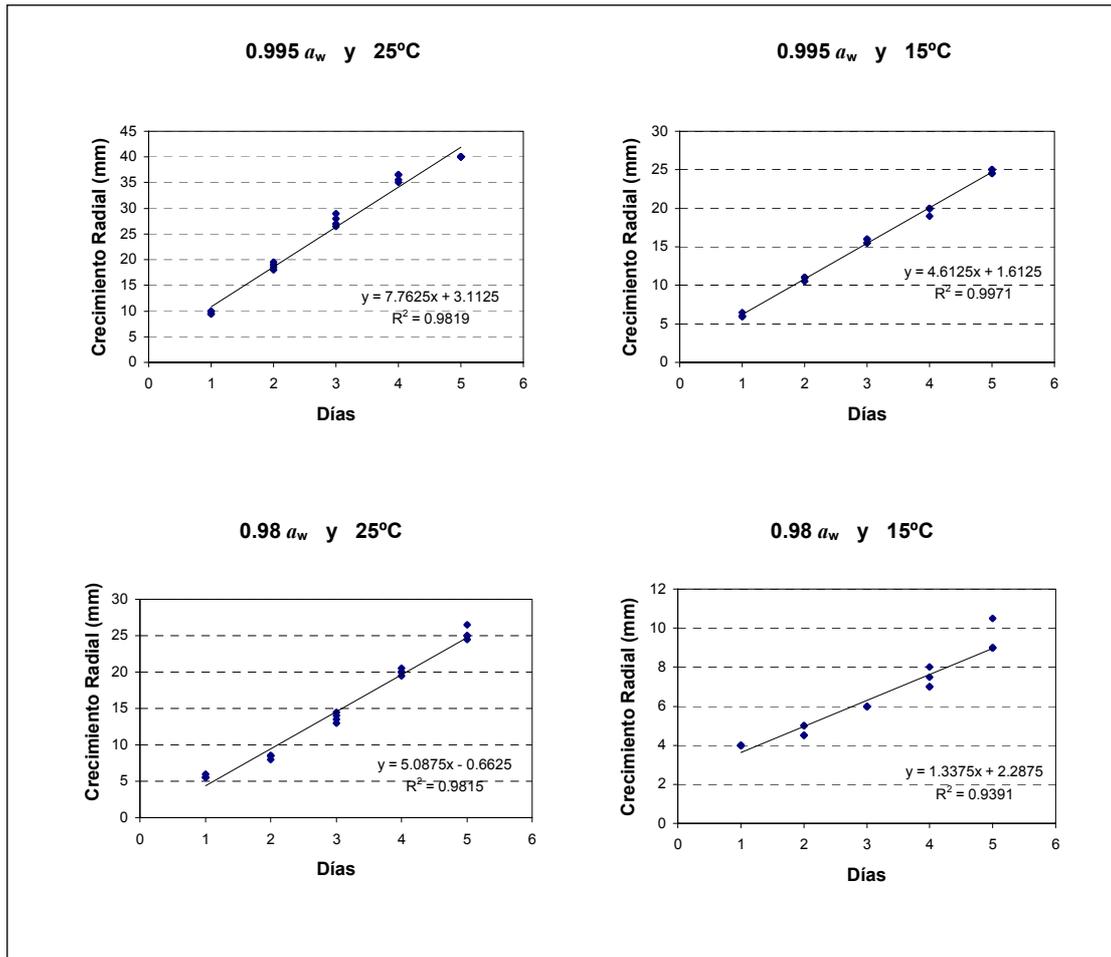


Figura A-2: Crecimiento de TH en PDA a diferentes T y a_w .

Figura A-3: Crecimiento de RS en PDA a diferentes T y a_w .

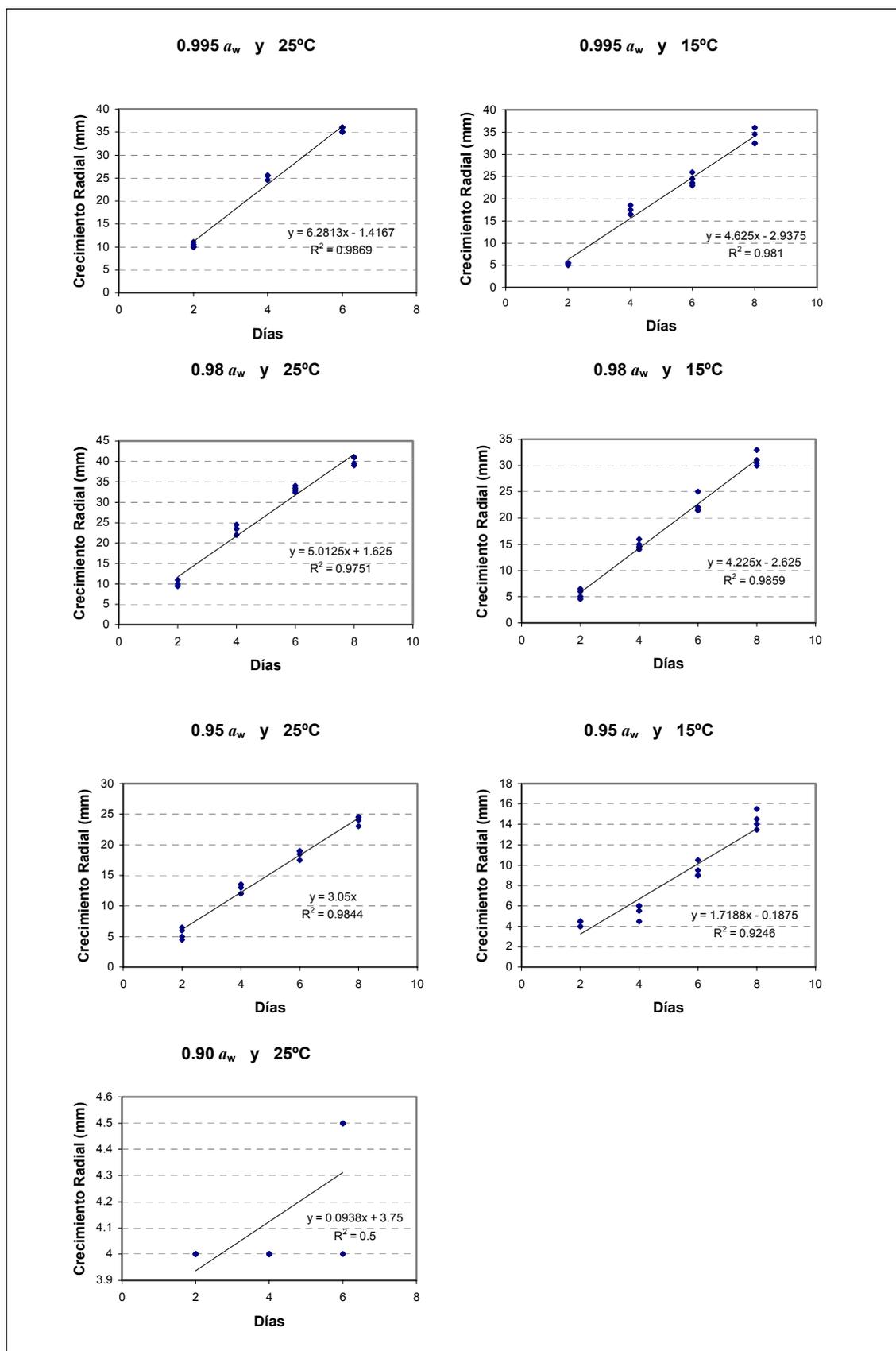


Figura A-4: Crecimiento de FOL1 en PDA a diferentes T y a_w .

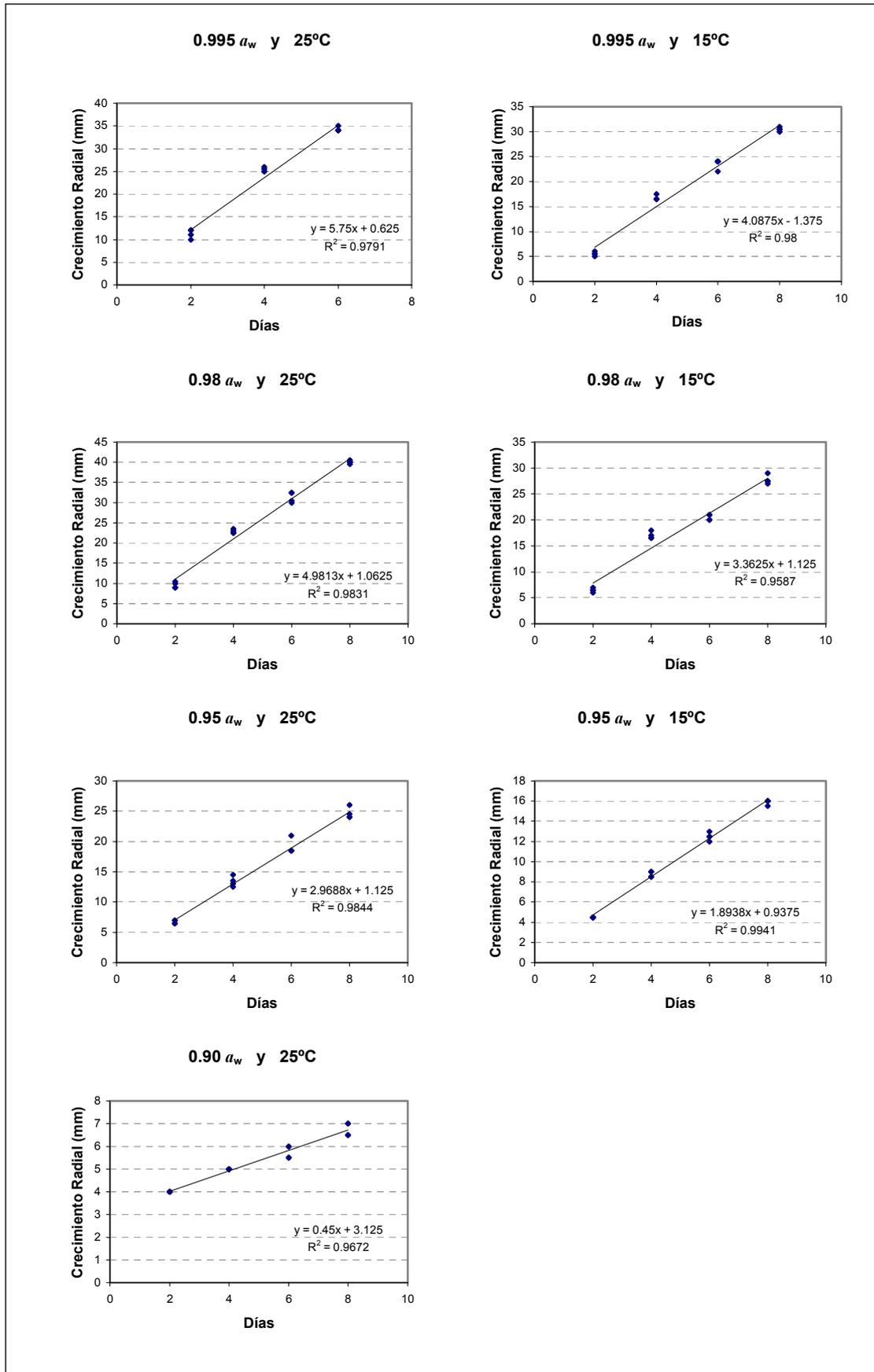


Figura A-5: Crecimiento de FOL2 en PDA a diferentes T y a_w .

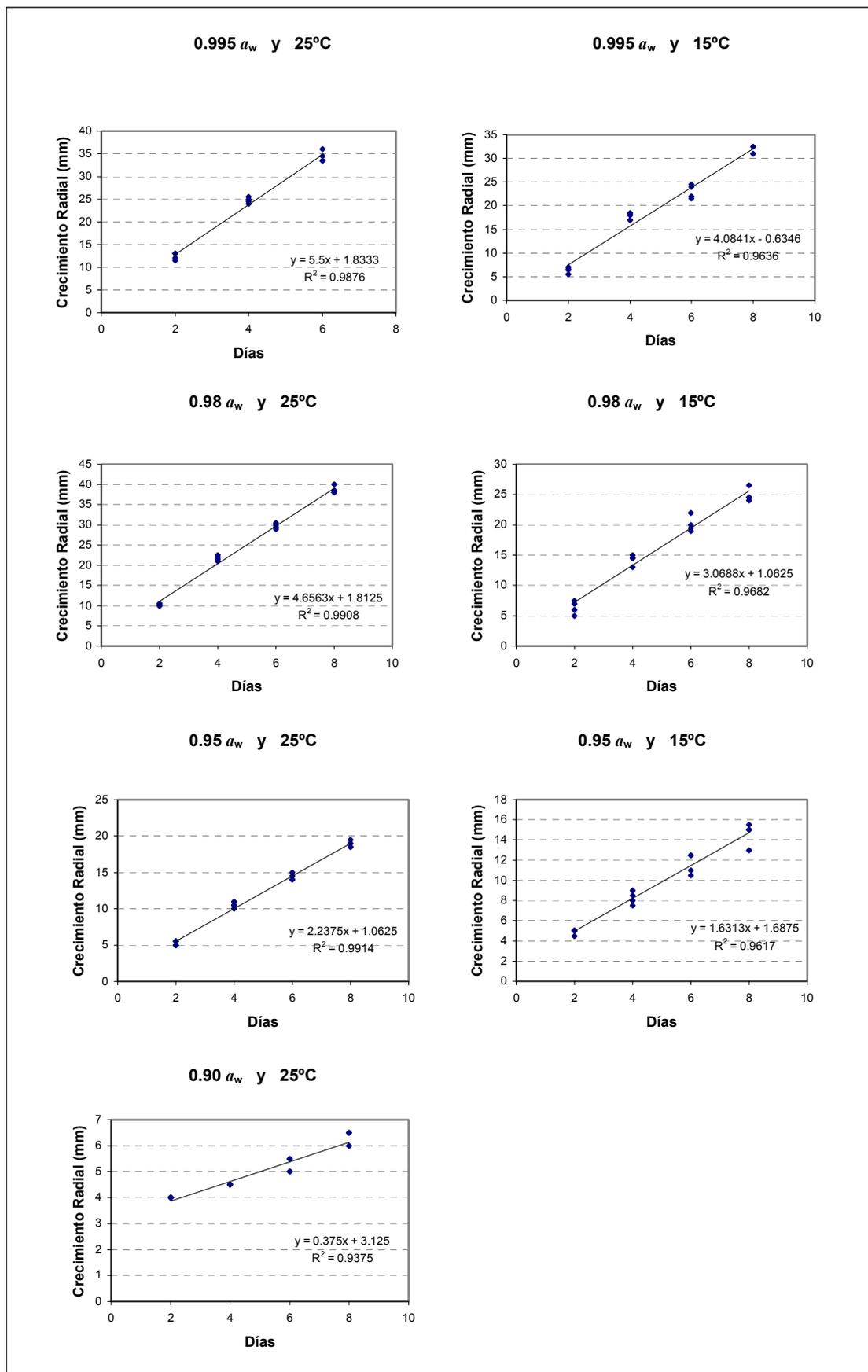


Figura A-6: Crecimiento de FOG1 en PDA a diferentes T y a_w .

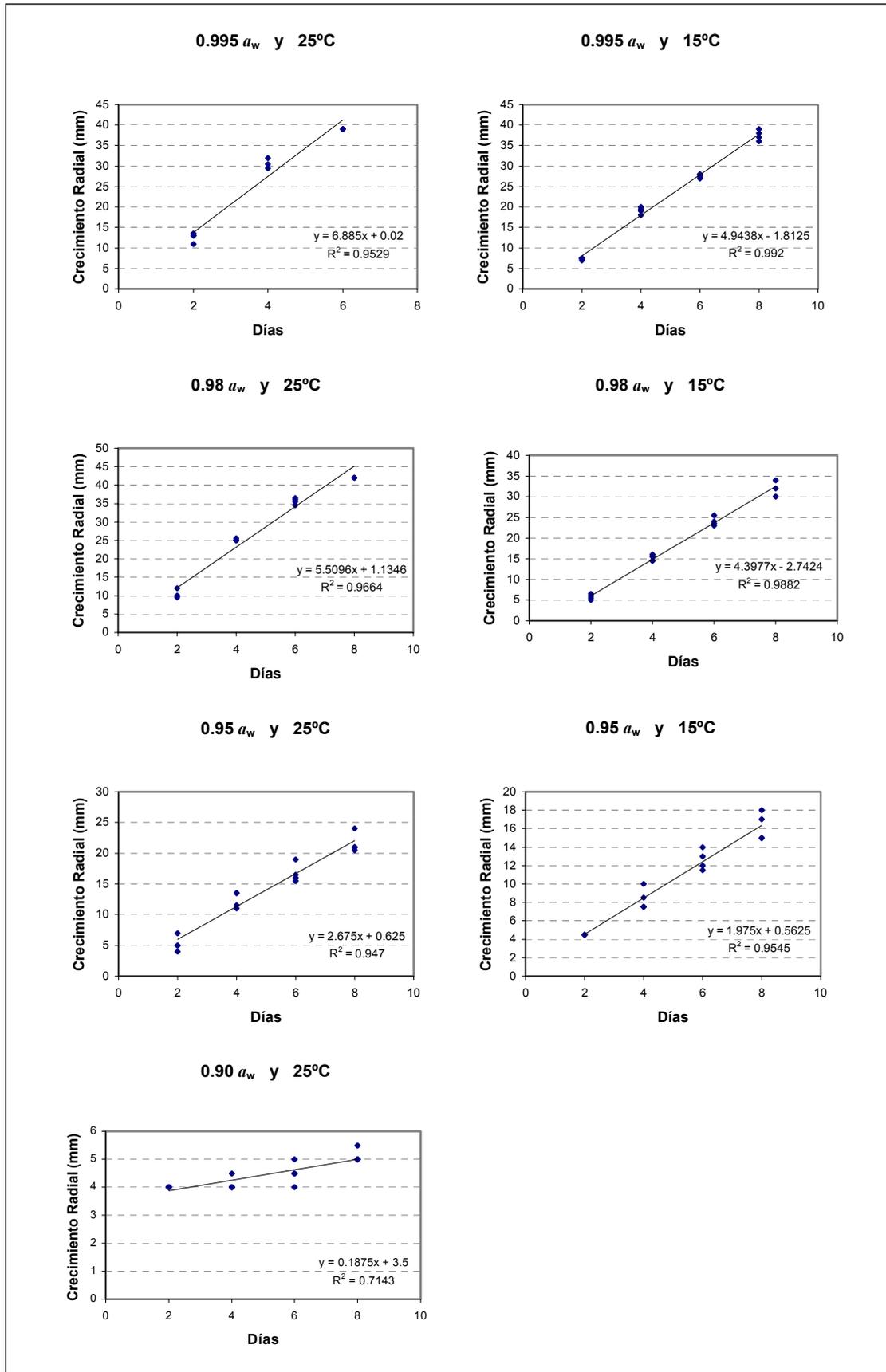
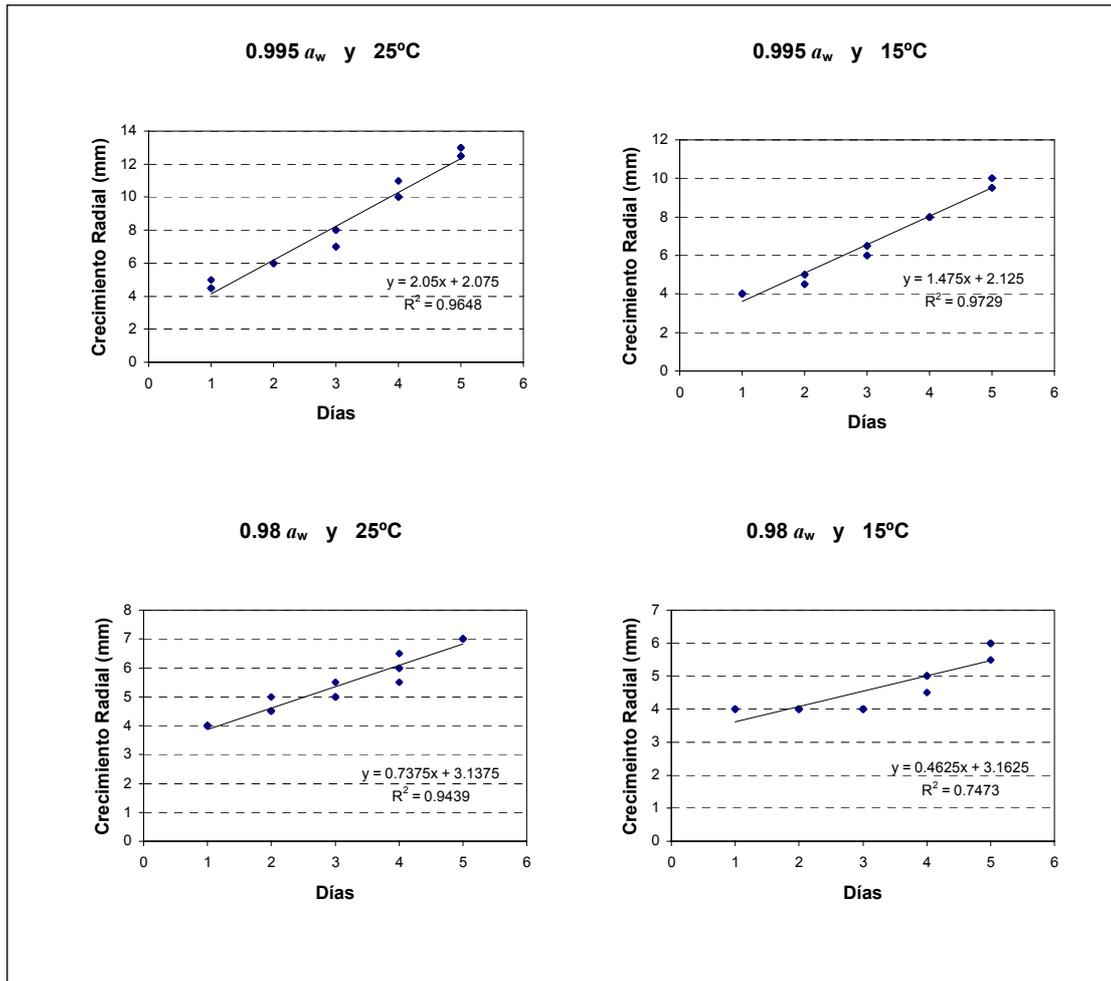


Figura A-7: Crecimiento de FOG2 en PDA a diferentes T y a_w .

Figura A-8: Crecimiento de VD en PDA a diferentes T y a_w .

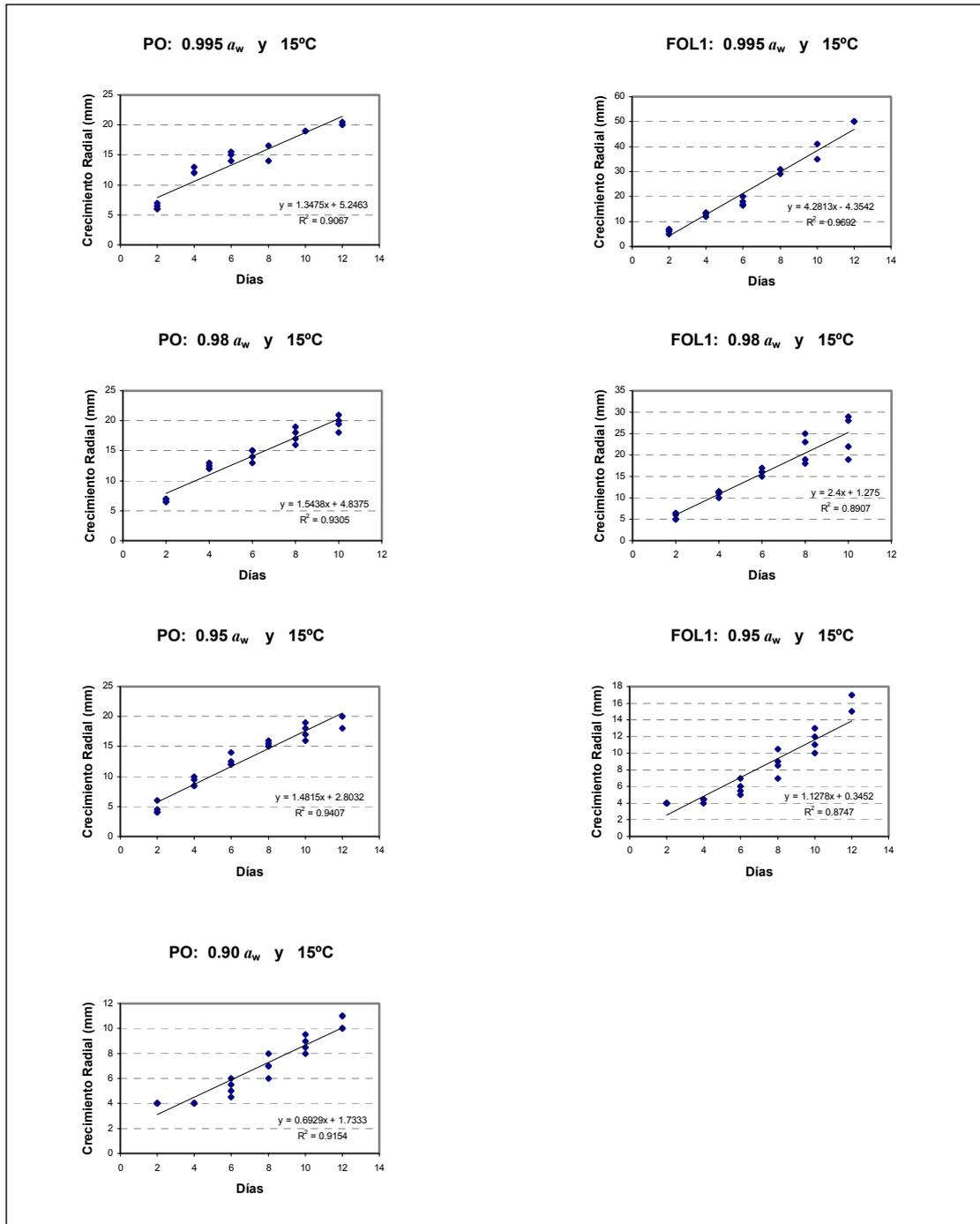


Figura B-1: Crecimiento dual de PO-FOL1 en PDA a 15°C para las diferentes a_w .

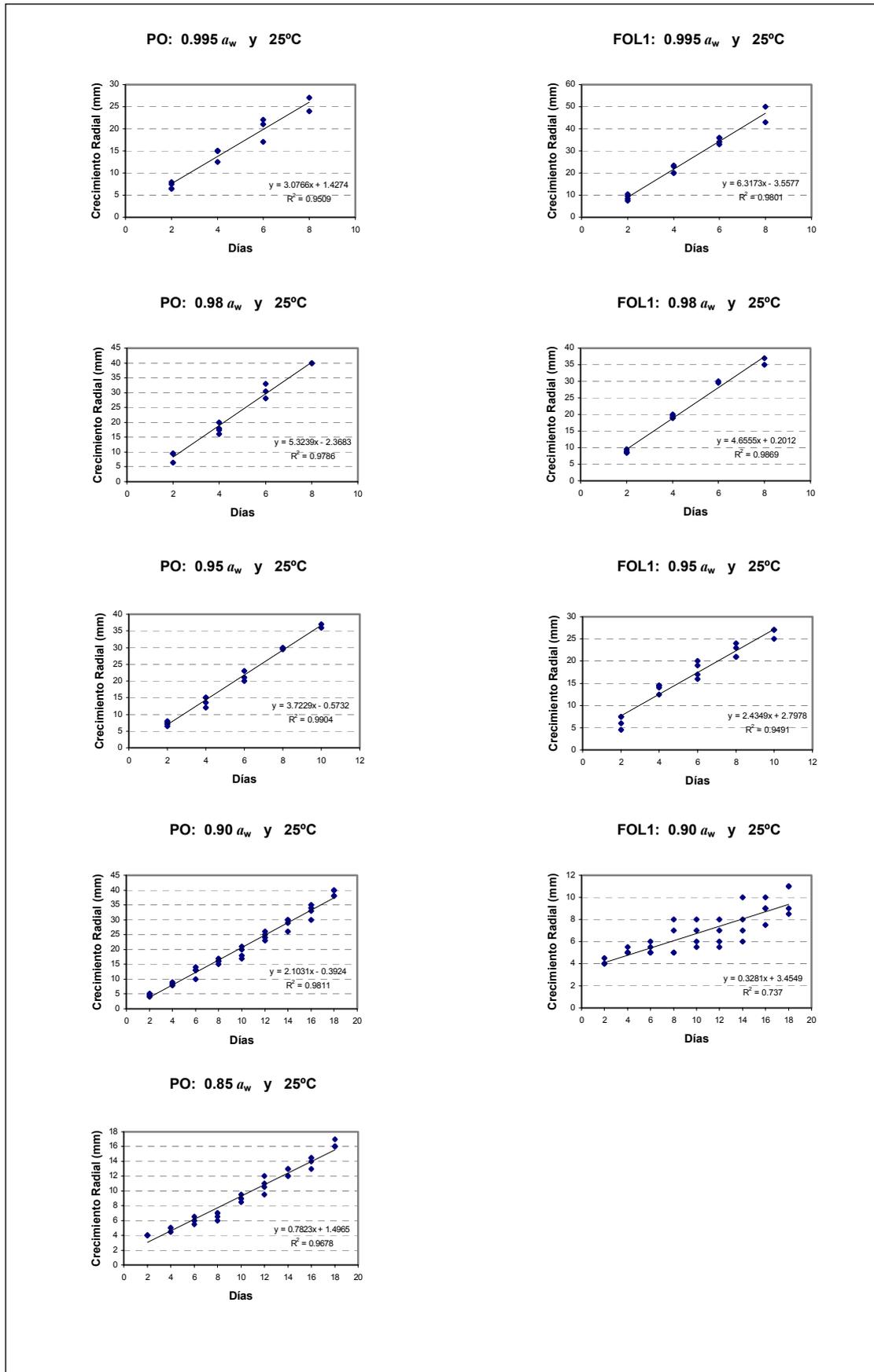


Figura B-2: Crecimiento dual de PO-FOL1 en PDA a 25°C para las diferentes a_w .

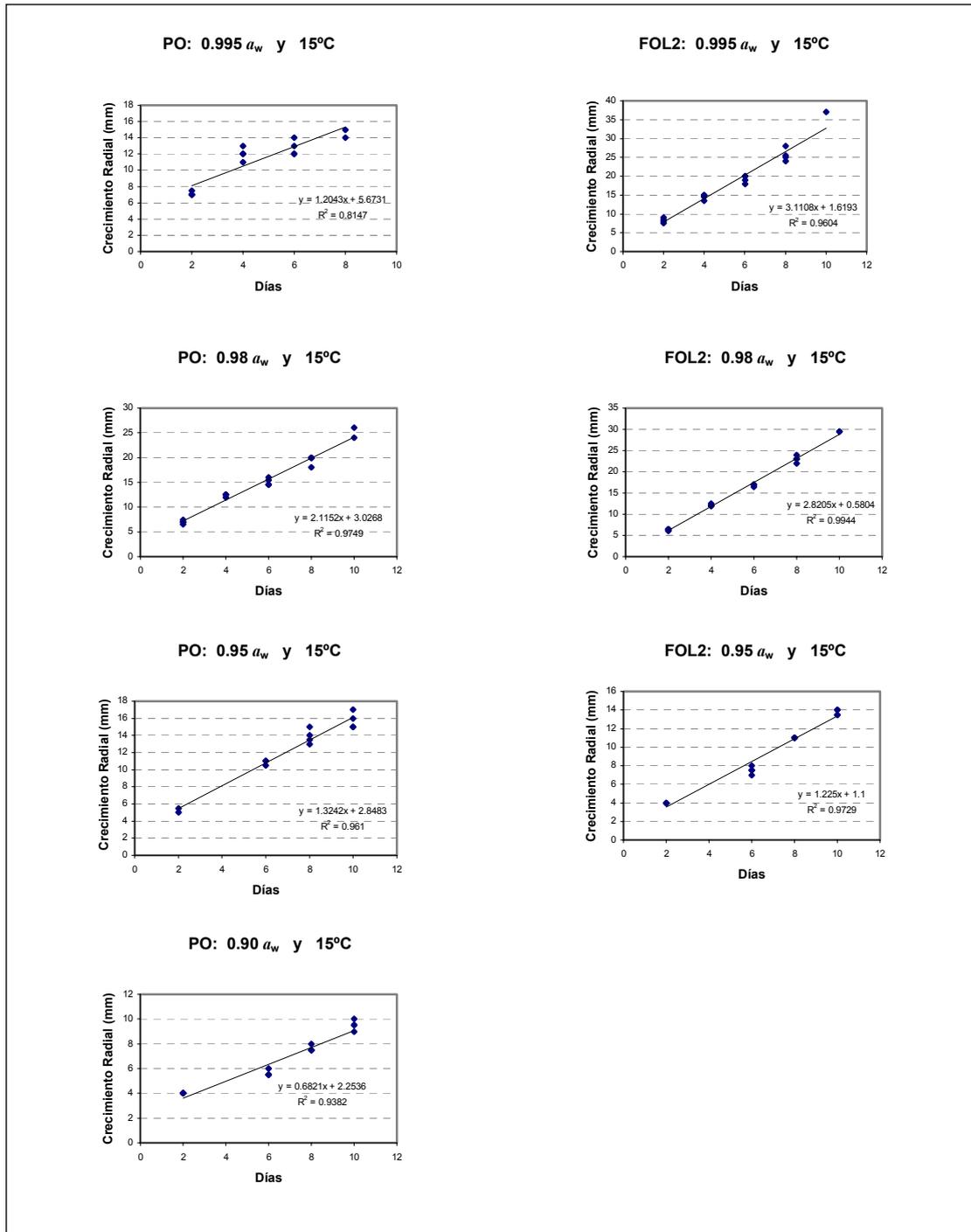


Figura B-3: Crecimiento dual de PO-FOL2 en PDA a 15°C para las diferentes a_w .

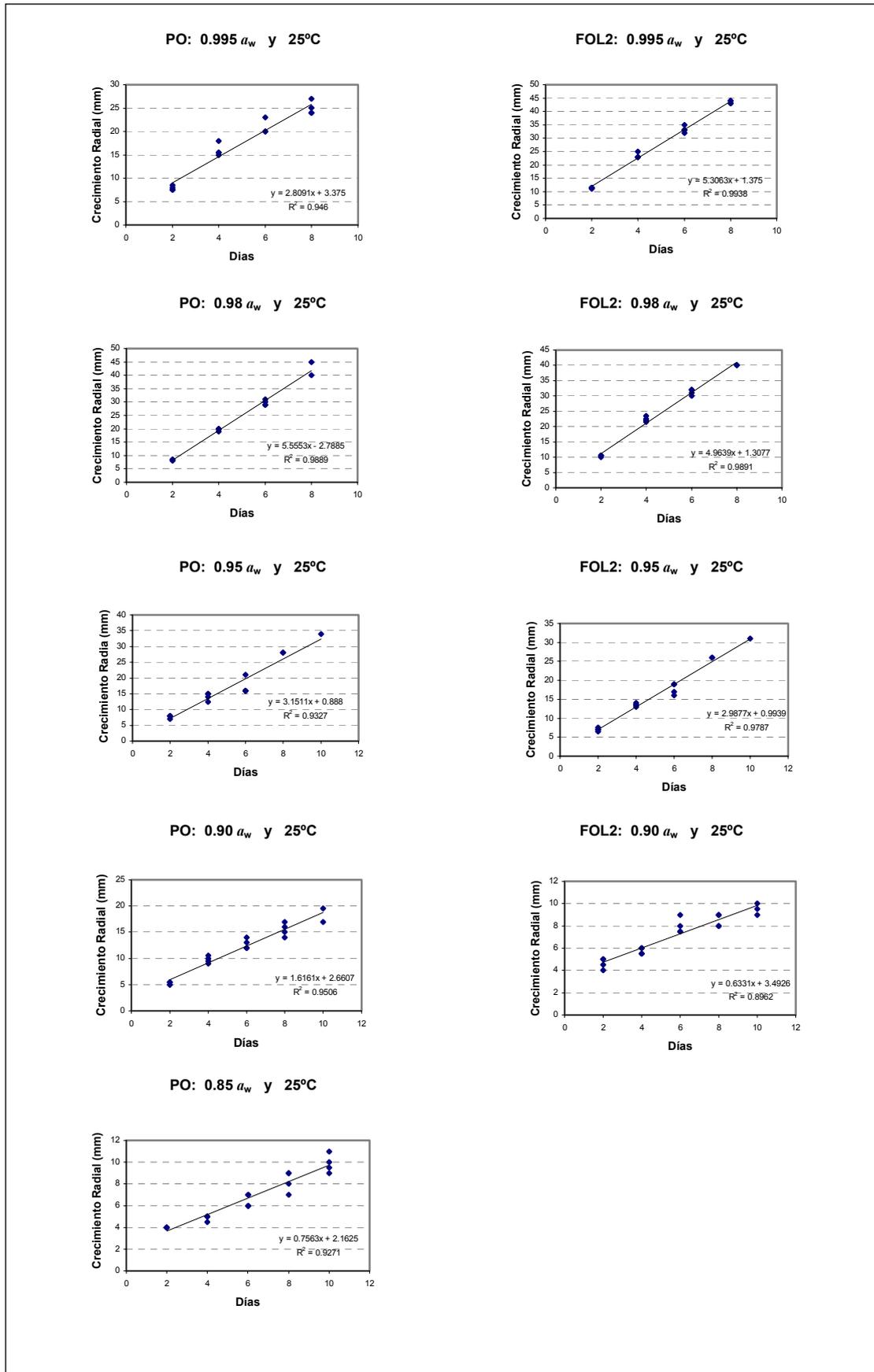


Figura B-4: Crecimiento dual de PO-FOL2 en PDA a 25°C para las diferentes a_w .

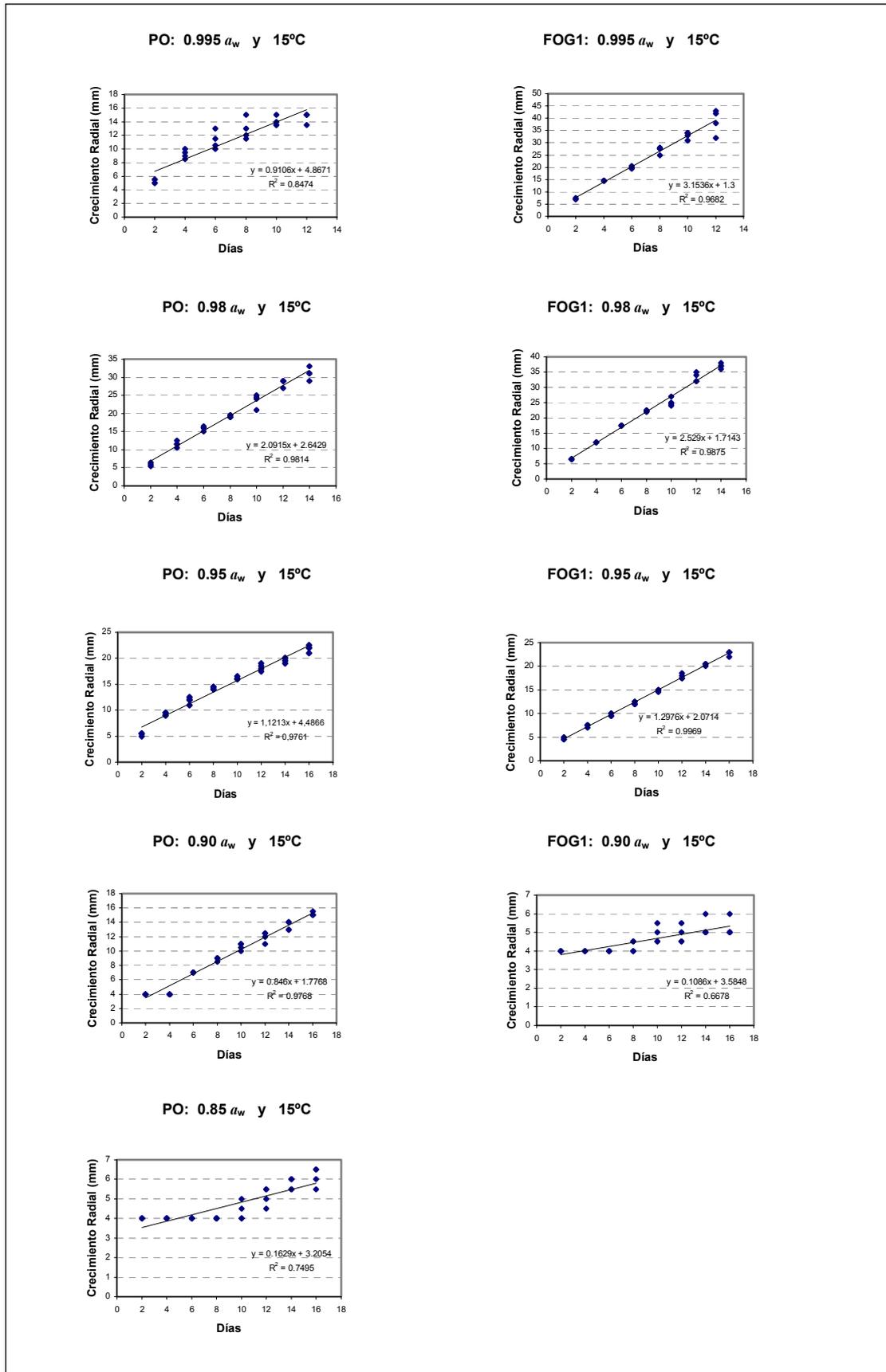


Figura B-5: Crecimiento dual de PO-FOG1 en PDA a 15°C para las diferentes a_w .

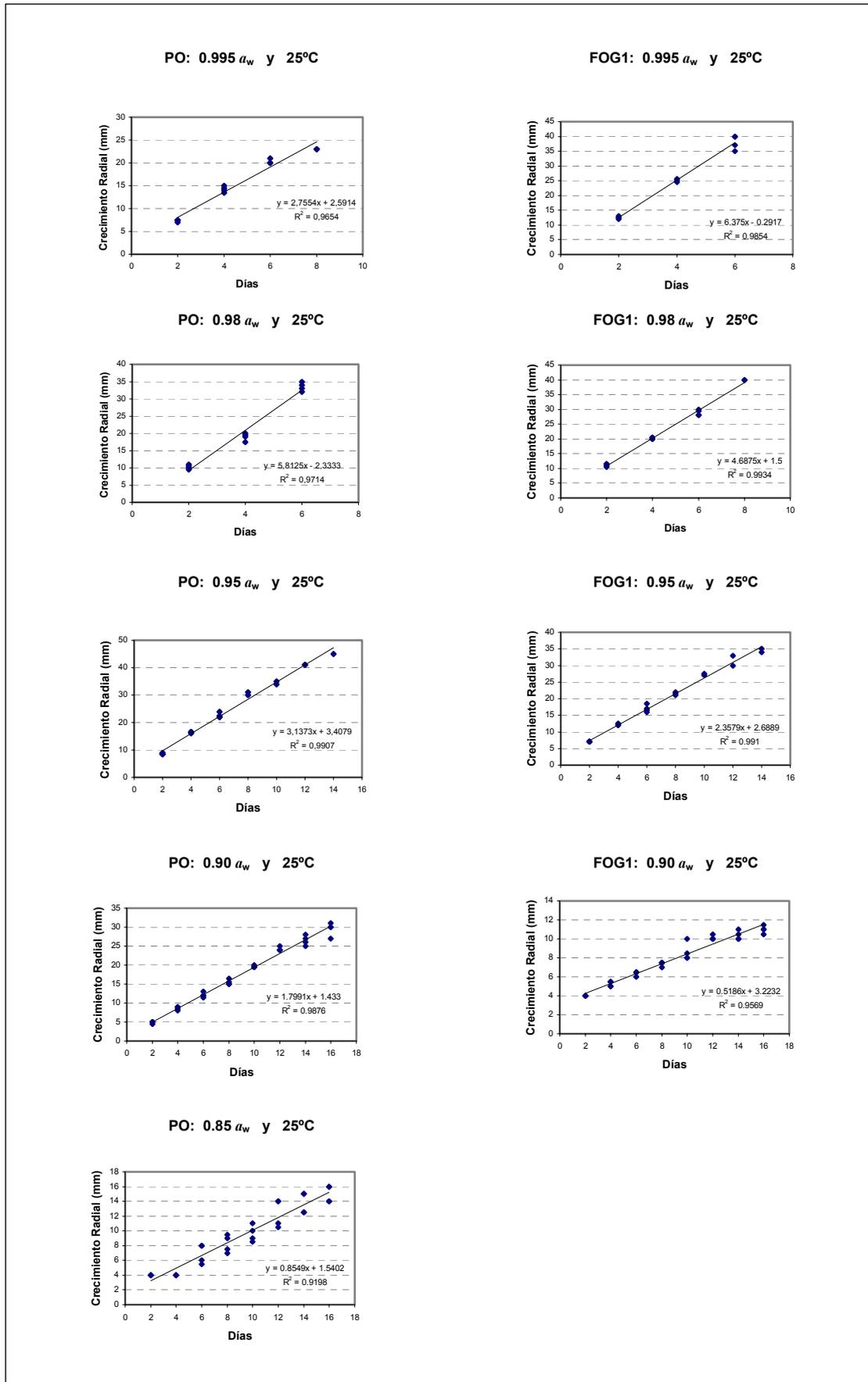


Figura B-6: Crecimiento dual de PO-FOG1 en PDA a 25°C para las diferentes a_w .

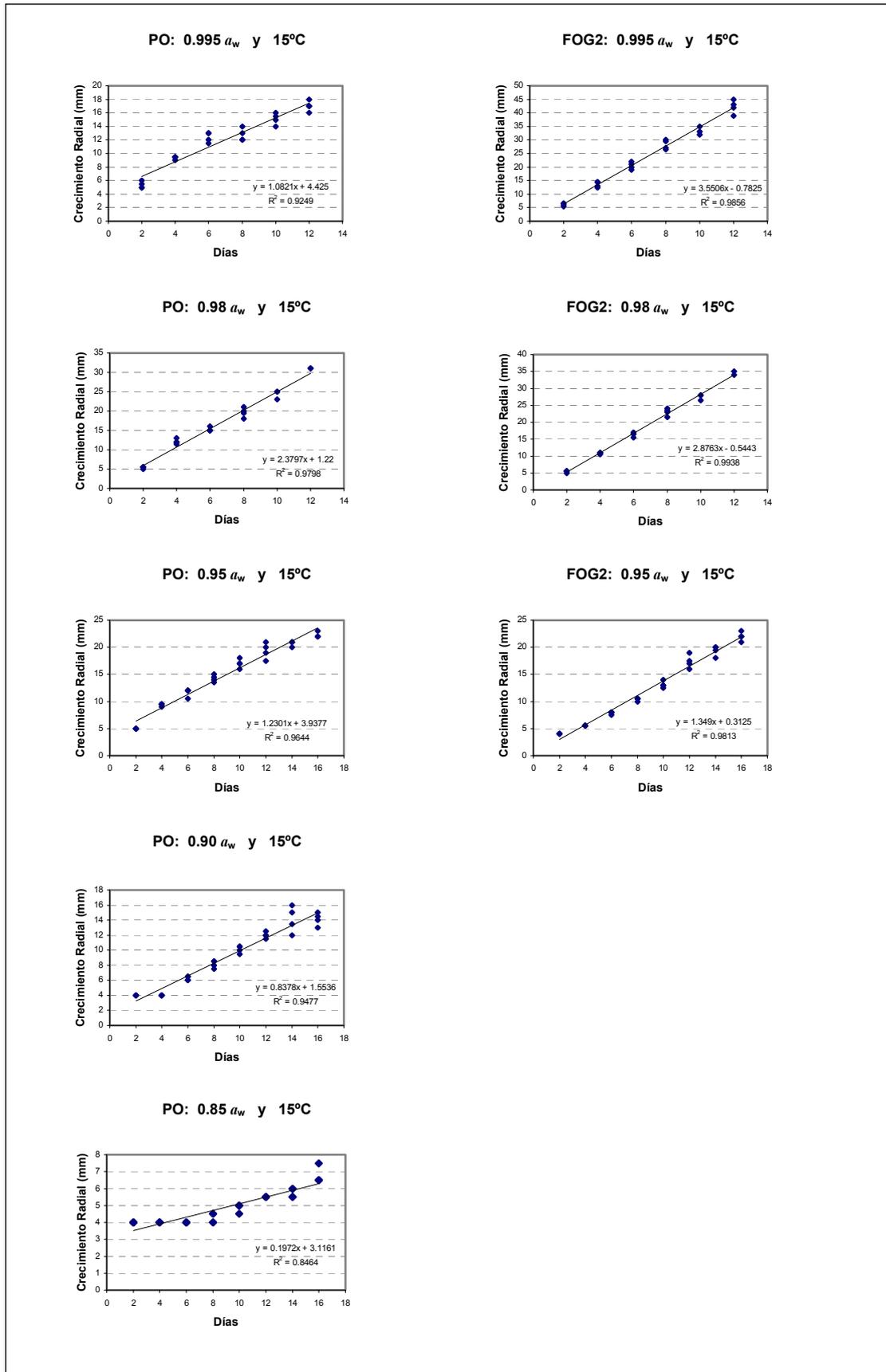


Figura B-7: Crecimiento dual de PO-FOG2 en PDA a 15°C para las diferentes a_w .

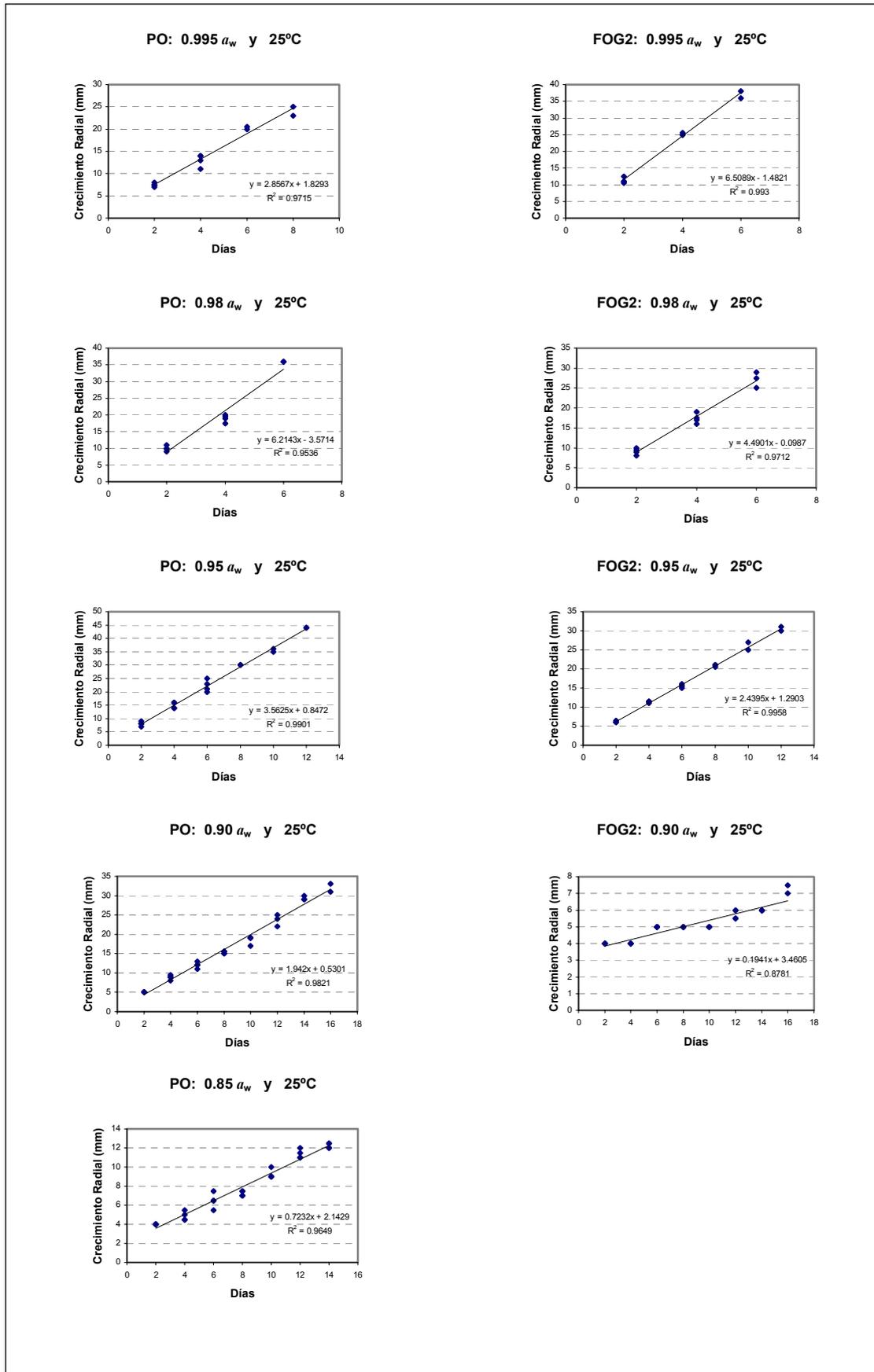


Figura B-8: Crecimiento dual de PO-FOG2 en PDA a 25°C para las diferentes a_w .

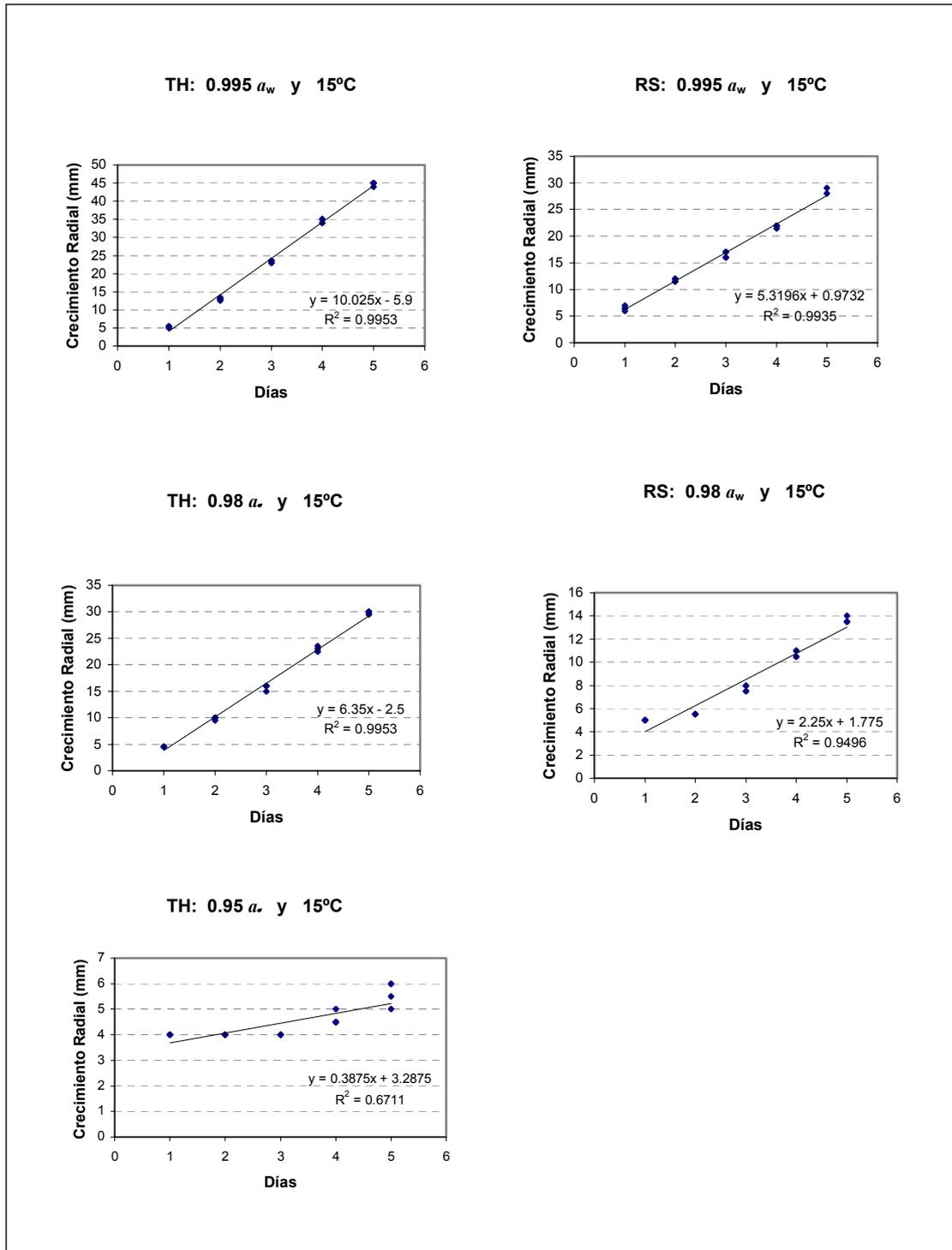


Figura C-1: Crecimiento dual de TH-RS en PDA a 15°C para las diferentes a_w .

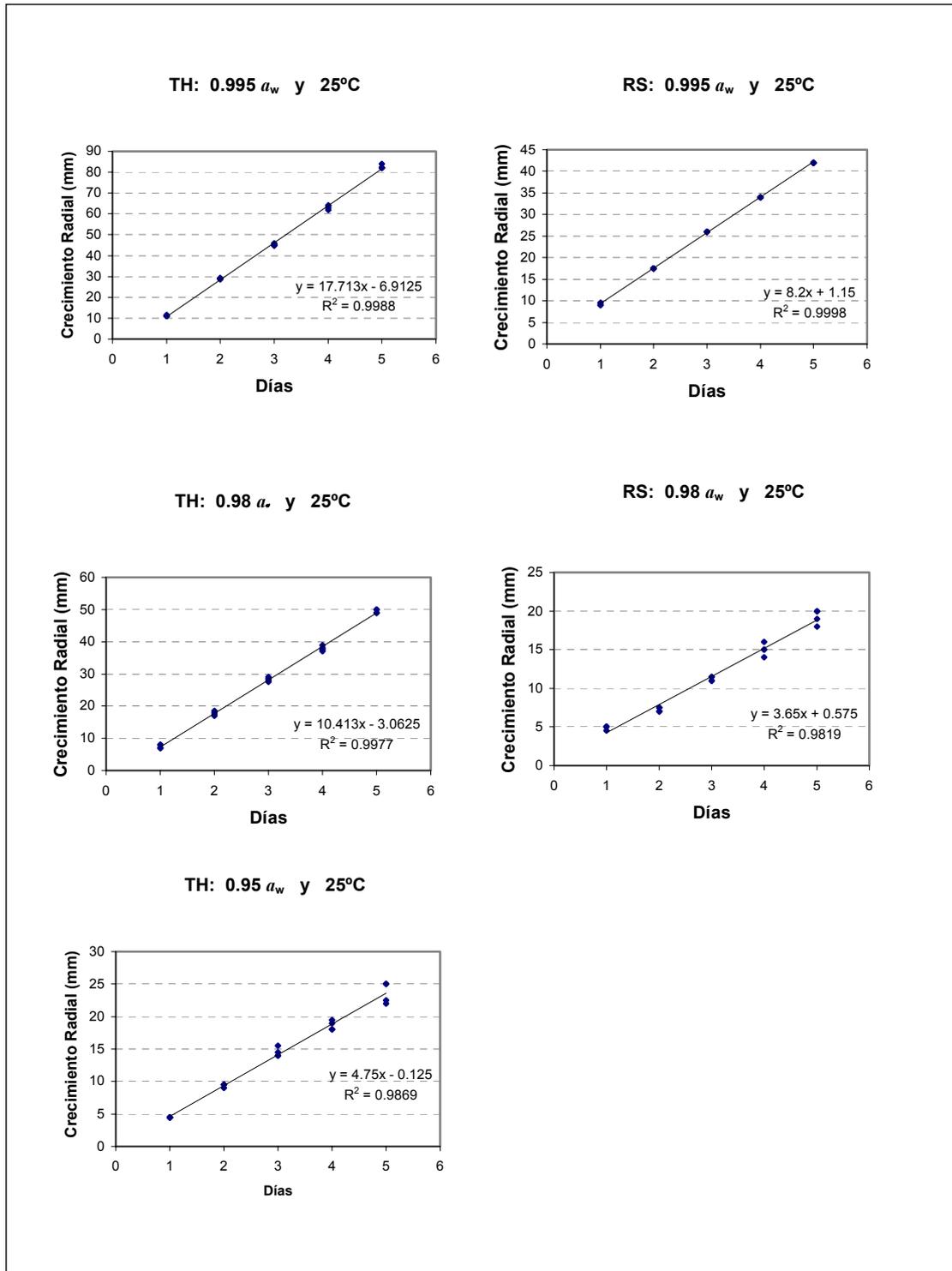


Figura C-2: Crecimiento dual de TH-RS en PDA a 25°C para las diferentes a_w .

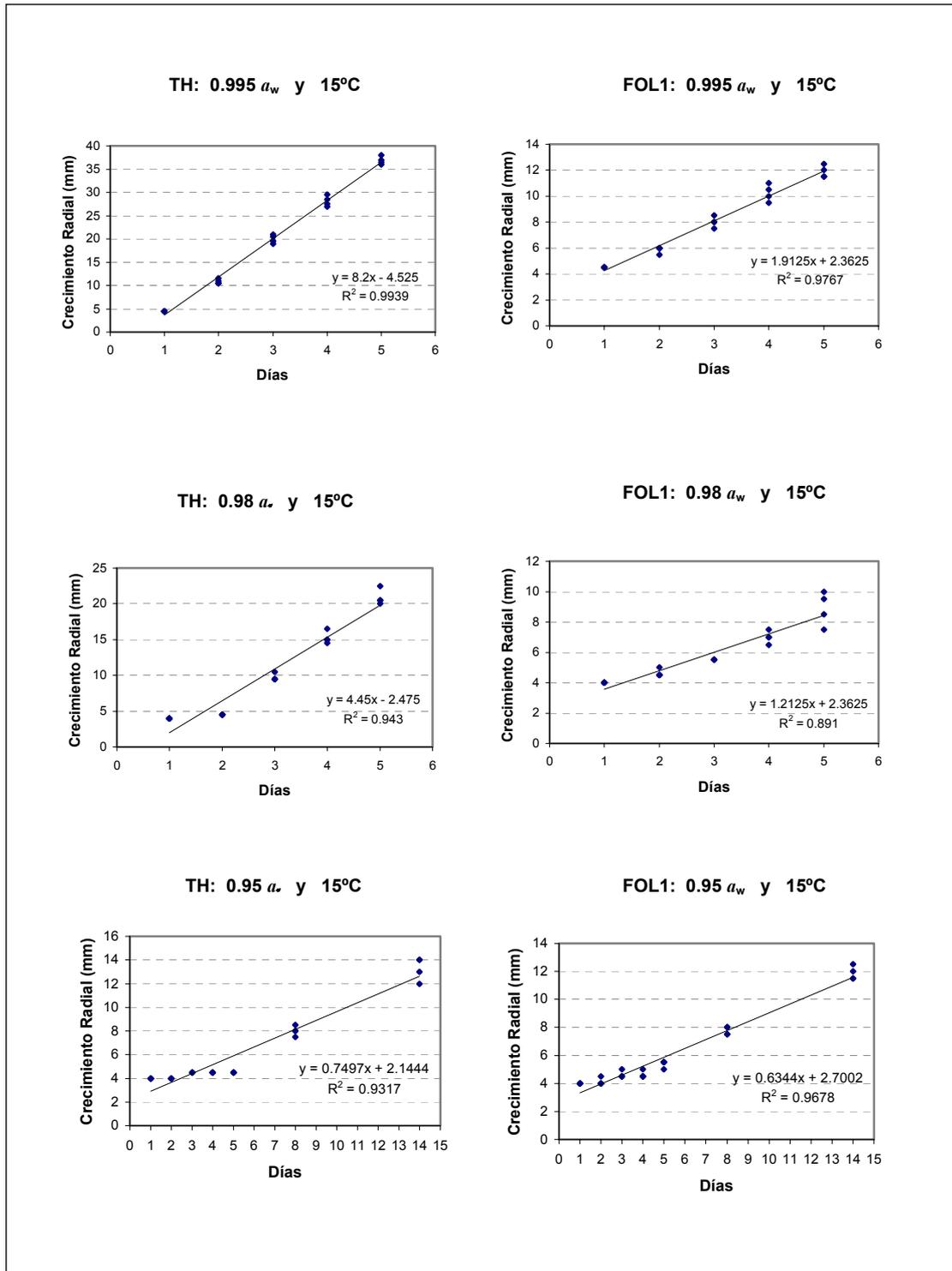


Figura C-3: Crecimiento dual de TH-FOL1 en PDA a 15°C para las diferentes a_w .

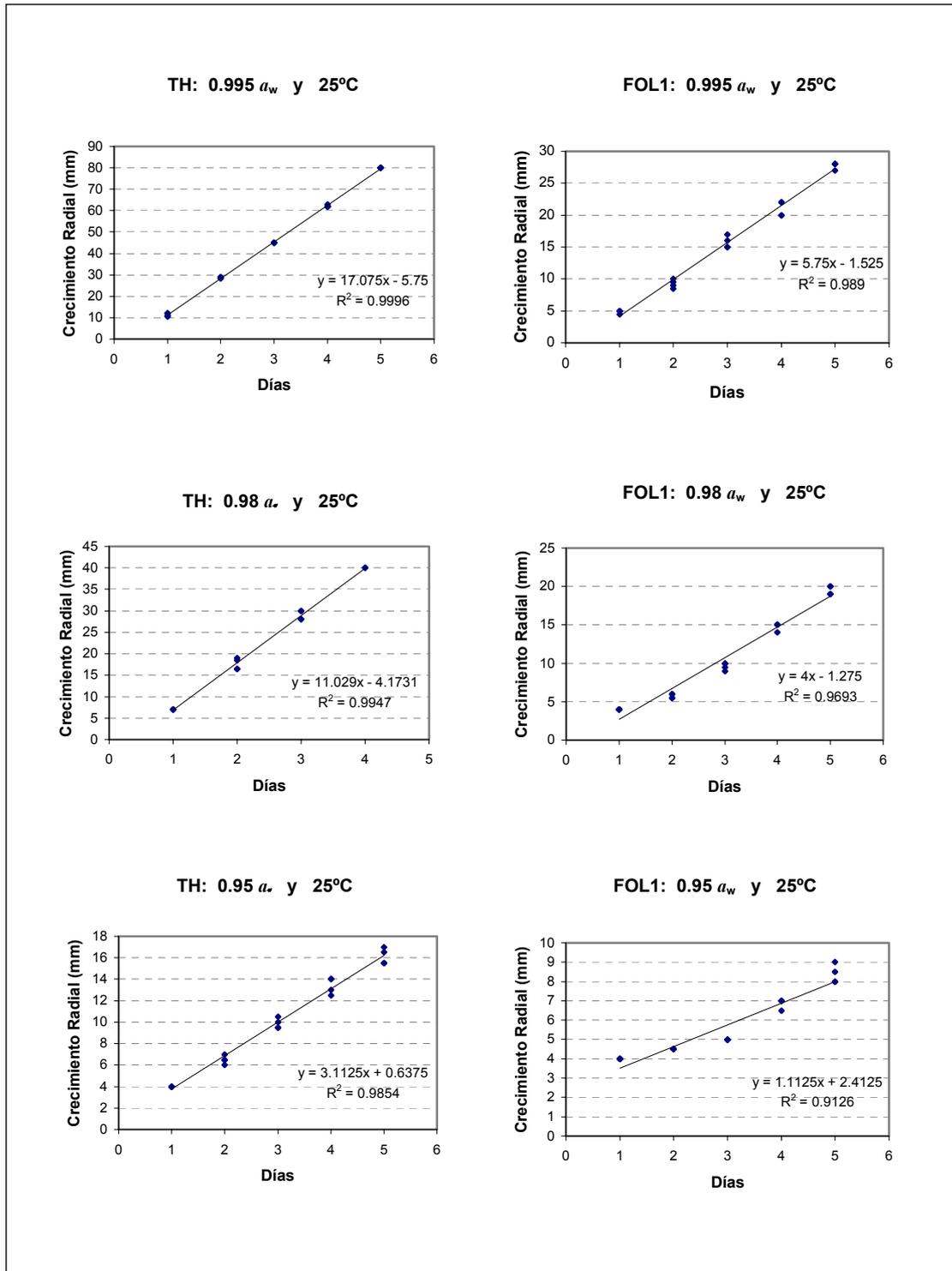


Figura C-4: Crecimiento dual de TH-FOL1 en PDA a 25°C para las diferentes a_w .

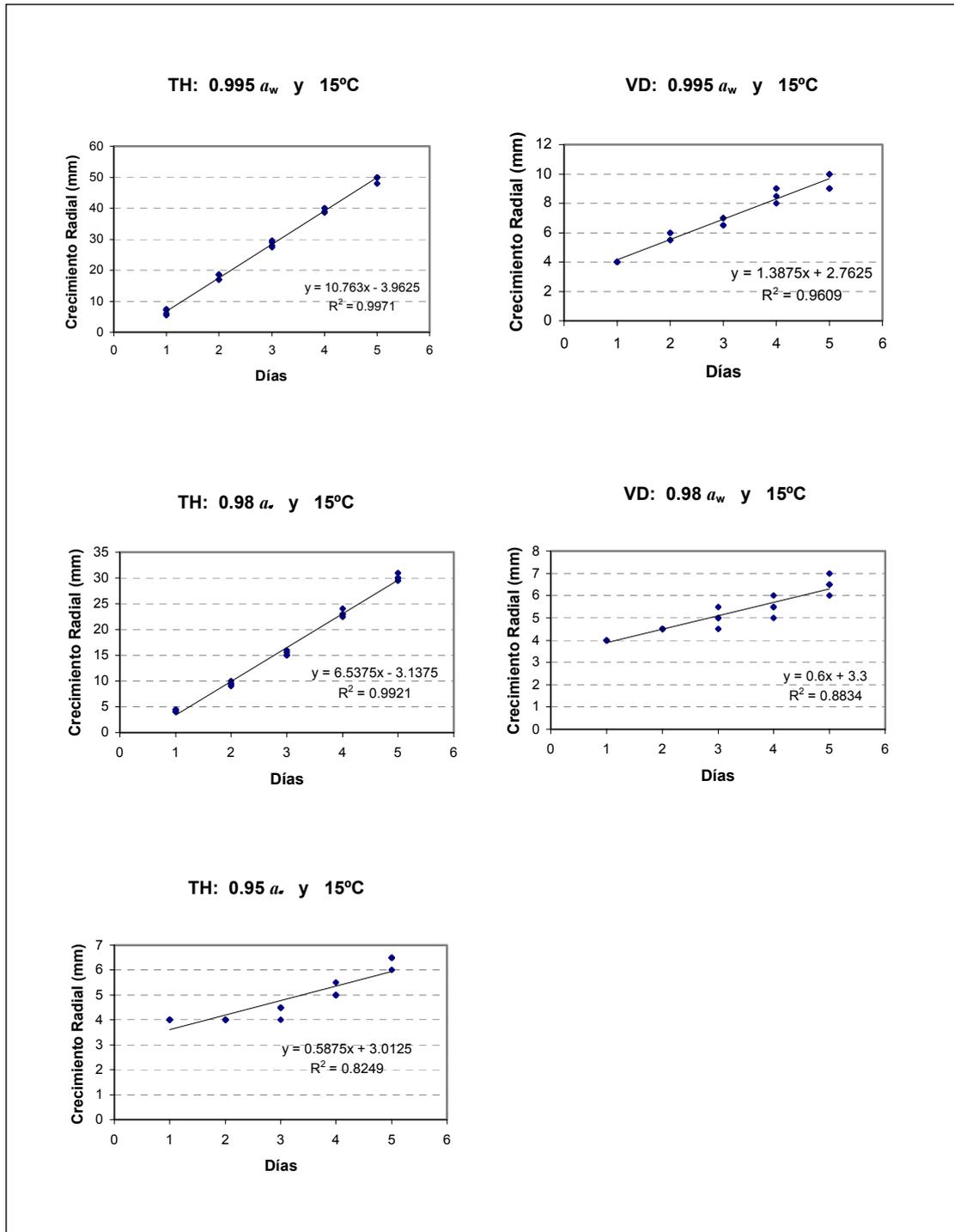


Figura C-5: Crecimiento dual de TH-VD en PDA a 15°C para las diferentes a_w .

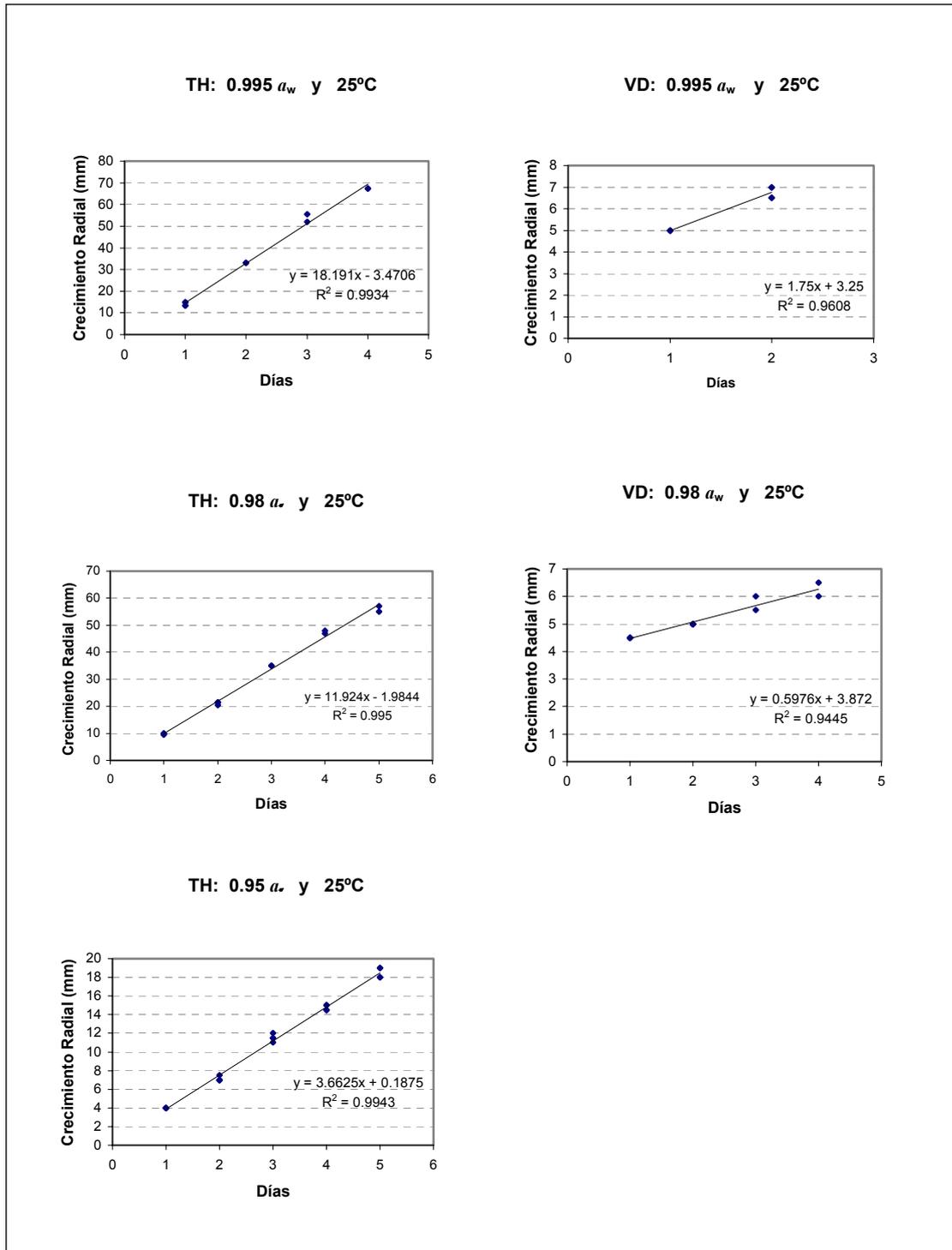


Figura C-6: Crecimiento dual de TH-VD en PDA a 25°C para las diferentes a_w .