

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Microbiología y Parasitología

TESIS DOCTORAL

Caracterización de la población de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en la costa Noroeste de Cádiz y control mediante composts supresivos de las marchiteces vasculares

Raúl Castaño Muñoz

Sevilla, 2012



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Microbiología y Parasitología

TESIS DOCTORAL

Caracterización de la población de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en la costa Noroeste de Cádiz y control mediante composts supresivos de las marchiteces vasculares

Autor: Raúl Castaño Muñoz  
Licenciado en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Manuel Avilés Guerrero  
Catedrático de Escuela Universitaria  
Departamento de Ciencias Agroforestales  
E.T.S.I.A.  
Universidad de Sevilla

Tutor: Dr. Miguel Ángel Caviedes Formento  
Profesor Titular de Universidad  
Departamento de Microbiología y Parasitología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2012



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Microbiología y Parasitología

Máster de postgrado: Biología Molecular y Biotecnología Vegetal

TESIS DOCTORAL

Caracterización de la población de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en la costa Noroeste de Cádiz y control mediante composts supresivos de las marchiteces vasculares


Memoria de Tesis presentada por Raúl Castaño Muñoz para optar por el título de doctor por la Universidad de Sevilla.

Doctorando



Raúl Castaño Muñoz

Vº Bº Director:



Manuel Avilés Guerrero

Vº Bº Tutor:



Miguel Ángel Caviedes  
Formento

Sevilla, 2012



## PRÓLOGO

Esta tesis comprende de cuatro trabajos en forma de artículos de investigación relativos a la supresividad de tres sustratos formulados con composts a la fusariosis vascular del clavel y del tomate y a la verticilosis vascular del algodón y del olivo. Además, hacemos un profundo estudio biológico y molecular de la población del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en una zona con una alta tradición en el cultivo del clavel.

- El primero de estos trabajos es un artículo aceptado con revisión en la revista **Plant Disease**, denominado “*Biological and Molecular Characterization of Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Southern Spain”.
- El segundo artículo fue publicado en la revista **Biological Control** en el año 2011 con el título “*Organic Matter Fractions by SP-MAS <sup>13</sup>C NMR and Microbial Communities involved in the Suppression of Fusarium Wilt in Organic Growth Media*”.
- El tercer artículo fue publicado en la revista **Biocontrol** en el año 2012 con el título “*Selection of Biological Control Agents Against Tomato Fusarium wilt and Evaluation in Greenhouse Conditions of Two Selected Agents in Three Growing Media*”.
- El cuarto trabajo, denominado “*Factors that Affect the Capacity of Growing Media to Suppress Verticillium Wilt*”, fue presentado como comunicación en el pasado ‘International Symposium on Growing Media, Composting and Substrate Analysis’, organizado por la ISHS (International Society for Horticultural Science) celebrado en Barcelona del 14 al 21 de Octubre del 2011. Posteriormente fue aceptado en 2012 para publicación en **Acta Horticulturae**.

Con el fin de integrar los trabajos descritos, facilitar entendimiento del conjunto de la tesis y, así, cumplir con la normativa vigente en esta Universidad, se ha elaborado introducción general, objetivos, resumen de cada artículo, discusión y conclusiones en castellano.





## AGRADECIMIENTOS

*‘Llegando al final, todo se ve diferente...’*

Quiero comenzar agradeciendo la paciencia, el esfuerzo y el tiempo dedicado a esta Tesis Doctoral al Dr. Don Manuel Avilés Guerrero. Para mí, un profesional de la Fitopatología tan importante como respetable, con un conocimiento infinito y una gran virtud docente. Aunque más tengo que agradecer su apoyo post-tesis, que me está brindado la oportunidad de apreciar, de verdad, su amistad. ¡Gracias por seguir estando ahí!. A mi Tutor, M.A. Caviedes, que me ayudó en los momentos de papeleo que tanto me desesperaban.

A mis compañeras de laboratorio, Celia, Silvia C., Silvia P. y a mi M. Luz (que sin ellas no habría existido gran parte de esta Tesis) que me han hecho sentirme siempre como uno más. A todos los compañeros de fatigas y terapias durante sus proyectos: Alma, José Carlos, Isa, Manuel, Paxi, Rafael, Jesús, ... y especialmente a mis ojitos derechos, Pepe, Carmen y Aurora. A la zona despachito, con Ana's, Oliva, Rocío, Paloma, Inma, Nur, Puri ... ¡que buenas comidas pasamos!. A todos los profesores que me han hecho la estancia en la ETSIA tan agradable, donde siempre me he sentido más compañero que alumno.

A mis compañeros del IRNASE, a mi Pili (¡¡lo conseguí!!), a mi Juanichi (mi juanco), a Vicky (mi valenciana), a mi norteño Javi y a José. Y un rinconcito especial para los Doctores Juan Jordano y Concepción Almoguera, que me enseñaron, de verdad, lo dura y realista que es la ciencia.

Pero lo verdaderamente importante en mi vida se escribe con otro tipo de letra, una más especial, mimando y acariciando un susurro dulce a voz en grito. Quiero dedicar con toda mi alma esta Tesis Doctoral a mis padres, José y Conchi, a la luz de mi vida, Raquel, a la que quiero con locura y, como no, a mi bichito Dani, a mi niño, a mi ángel, a mi sentido en la vida. ¡¡Lo sois todo para mí!! A mi hermano, José, que seguro que está muy orgulloso de mí, y a toda mi ‘otra familia’, que siempre me ha apoyado cuando me veía bastante rendido.

Tanto son los años empleados que la lista de gente a la que estoy agradeciendo de corazón posiblemente se me haya quedado corta. A todos los demás, **muchísimas gracias**.

Un nuevo barco me espera, espero llevar bien el timón y llegar a buen puerto, puesto que la tripulación necesaria la llevo en mi alma y en mis recuerdos.

*‘Permite que te invite a la despedida  
no importa que no merezca más tu atención  
así mi conciencia quedará más tranquila  
así en esta banda decimos adiós’*



# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN. LA AGRICULTURA Y SUS PROBLEMAS FITOSANITARIOS.....</b>	<b>9</b>
<b>2. LAS TRAQUEOMICOSIS EN LOS CULTIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>3. EL CULTIVO DEL CLAVEL Y DEL TOMATE. LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL CLAVEL Y DEL TOMATE .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.- EL CLAVEL. ORIGEN Y TAXONOMÍA. PRODUCCIÓN EN ESPAÑA Y ANDALUCÍA.....</b>	<b>11</b>
3.1.1. <i>Origen del clavel.</i> .....	11
3.1.2. <i>Clasificación taxonómica del clavel.</i> .....	12
3.1.3. <i>El comercio mundial del clavel. Producción del clavel en España.</i> .....	12
3.1.4. <i>Producción del clavel en Andalucía.</i> .....	12
<b>3.2. EL TOMATE. ORIGEN Y TAXONOMÍA. PRODUCCIÓN EN ESPAÑA Y ANDALUCÍA.....</b>	<b>13</b>
3.2.1. <i>Origen de la tomatara.</i> .....	13
3.2.2. <i>Clasificación taxonómica de la tomatara.</i> .....	14
3.2.3. <i>El comercio mundial del tomate. Producción del tomate en España.</i> .....	14
3.2.4. <i>Producción del tomate en Andalucía</i> .....	14
<b>3.3. FUSARIUM OXYSPORUM, AGENTE CAUSAL DE LAS FUSARIOSIS VASCULARES. ....</b>	<b>15</b>
3.3.1. <i>Sintomatología general de las Fusariosis vasculares.</i> .....	15
3.3.2. <i>Definición de formae specialis y razas.</i> .....	17
3.3.3. <i>Fusariosis vasculares del clavel. Epidemiología, taxonomía y clasificación racial.</i> ...17	
3.3.3.1. <i>Fusariosis vascular del clavel.</i> .....	17
3.3.3.2. <i>Clasificación taxonómica de F. oxyporum f. sp. dianthi.</i> .....	18
3.3.3.3. <i>Epidemiología de F. oxyporum f. sp. dianthi.</i> .....	18
3.3.3.4. <i>Caracterización racial de F. oxyporum f. sp. dianthi</i> .....	19
3.3.2. <i>Fusariosis vascular del tomate. Epidemiología, taxonomía y clasificación racial.</i> .....20	
3.3.2.1. <i>Patógeno responsable de la Fusariosis vascular del tomate.</i> .....	20
3.3.2.2. <i>Clasificación taxonómica de F. oxysporum f. sp. lycopersici.</i> .....	20
3.3.2.3. <i>Epidemiología de F. oxysporum f. sp. lycopersici.</i> .....	20
3.3.2.4. <i>Caracterización racial de F. oxysporum f. sp. lycopersici.</i> .....	21
<b>4. EL CULTIVO DEL ALGODONERO Y DEL OLIVO. LA VERTICILOSIS VASCULAR DEL ALGODONERO Y DEL OLIVO.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. EL ALGODONERO. ORIGEN Y TAXONOMÍA. PRODUCCIÓN EN ESPAÑA Y ANDALUCÍA.....</b>	<b>21</b>
4.1.1. <i>Origen del algodónero.</i> .....	21
4.1.2. <i>Clasificación taxonómica del algodónero.</i> .....	22
4.1.3. <i>El comercio mundial del algodón. Producción del algodón en España.</i> .....	22
4.1.4. <i>Producción del algodón en Andalucía.</i> .....	22

<b>4.2. EL OLIVO. ORIGEN Y TAXONOMÍA. PRODUCCIÓN EN ESPAÑA Y ANDALUCÍA.....</b>	<b>23</b>
4.2.1. <i>Origen del olivo.</i> .....	23
4.2.2. <i>Clasificación taxonómica del olivo.</i> .....	23
4.2.3. <i>El comercio mundial del olivo. Producción del olivo en España.</i> .....	24
4.2.4. <i>Producción del olivo en Andalucía.</i> .....	24
<b>4.3. VERTICILLIUM DAHLIAE, AGENTE CAUSAL DE LAS VERTICILOSIS VASCULARES.....</b>	<b>25</b>
4.3.1. <i>Clasificación taxonómica de V. dahliae.</i> .....	25
4.3.2. <i>Sintomatología de las Verticilosis vasculares.</i> .....	26
4.3.3. <i>Epidemiología de Verticillium dahliae.</i> .....	27
4.3.4. <i>Patotipos Defoliante y No defoliante.</i> .....	27
4.3.5. <i>La verticilosis vasculares del algodonero y del olivo.</i> .....	28
<b>5. MÉTODOS DE CONTROL FRENTE A ENFERMEDADES EN LOS CULTIVOS. CULTIVOS EN CONTENEDOR. SUSTRATOS CONDUCTIVOS A ENFERMEDADES VEGETALES.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1. PRÁCTICAS CULTURALES USADAS FRENTE A ENFERMEDADES EN LOS CULTIVOS. ....</b>	<b>28</b>
<b>5.2. CULTIVOS EN CONTENEDOR: SUSTRATOS MÁS UTILIZADOS. SUSTRATOS CONDUCTIVOS A ENFERMEDADES VEGETALES.....</b>	<b>31</b>
<b>6. SUPRESIVIDAD. SUELOS O SUSTRATOS SUPRESIVOS .....</b>	<b>32</b>
<b>7. LOS SUSTRATOS ORGÁNICOS COMPOSTADOS. EFECTOS SUPRESIVOS FRENTE A LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS.....</b>	<b>33</b>
<b>7.1. EL COMPOSTAJE. EL PROCESO DE COMPOSTAJE. ESTABILIDAD Y MADURACIÓN DE UN COMPOST. ....</b>	<b>33</b>
7.1.1. <i>El compostaje. Definición.</i> .....	33
7.1.2. <i>El proceso de compostaje.</i> .....	33
7.1.3. <i>Estabilidad y maduración de un compost para su empleo como sustrato vegetal.</i> .....	36
<b>8. RESIDUOS AGROINDUSTRIALES Y SU APROVECHAMIENTO COMO SUSTRATOS HORTÍCOLAS .....</b>	<b>39</b>
<b>9. TIPOS DE SUPRESIVIDAD Y MECANISMOS DE ACTUACIÓN. ....</b>	<b>41</b>
<b>9.1. TIPOS DE SUPRESIVIDAD.....</b>	<b>41</b>
<b>9.2. MECANISMOS DE ACTUACIÓN. ....</b>	<b>43</b>
<b>10. FACTORES QUE AFECTAN A LA SUPRESIVIDAD DE LOS SUSTRATOS ELABORADOS A BASE DE COMPOSTS. FACTORES QUÍMICOS, FÍSICOS Y BIOLÓGICOS.....</b>	<b>43</b>
<b>10.1. FACTORES FÍSICOS .....</b>	<b>44</b>
<b>10.2. FACTORES QUÍMICOS. ....</b>	<b>45</b>
<b>10.3. FACTORES BIOLÓGICOS.....</b>	<b>48</b>
10.3.1. <i>Los Agentes de Control Biológico.</i> .....	48

---

10.3.2. <i>Mecanismos de acción de los Agentes de Control Biológicos.</i> .....	49
10.3.3. <i>Tipos de Agentes de Control Biológico frente a las Fusariosis y Verticilosis vasculares.</i> .....	51
10.3.4. <i>Caracterización y calidad de la Materia Orgánica de los sustratos respecto a la actividad de los microorganismos presentes en los composts.</i> .....	53
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>55</b>
<b>CAPÍTULOS</b> .....	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO 1. Caracterización biológica y molecular de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> en el sur de España</b> .....	<b>61</b>
Abstract gráfico. ....	61
Resumen. ....	63
Manuscrito: “ <i>Biological and molecular characterization of Fusarium oxysporum f. sp. dianthi in Southern Spain</i> “. ....	65
Tablas. ....	93
Figuras. ....	100
<b>CAPÍTULO 2. Fracciones de la Materia Orgánica por Single Pulse-Magic Angle Spinning <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance y comunidades microbianas involucradas en la supresión de la Fusariosis vascular en medios de crecimiento vegetal.</b> .....	<b>107</b>
Abstract gráfico. ....	107
Resumen. ....	109
Artículo: “ <i>Organic matter fractions by SP-MAS <sup>13</sup>C NMR and microbial communities involved in the suppression of Fusarium wilt in organic growth media</i> “. ....	111
<b>CAPÍTULO 3. Selección de agentes de control biológico contra la Fusariosis vascular del tomate y evaluación en condiciones de invernadero de dos agentes seleccionados en tres medios de crecimiento</b> .....	<b>119</b>
Abstract gráfico. ....	119
Resumen. ....	121
Artículo: “ <i>Selection of biological control agents against tomato Fusarium wilt and evaluation in greenhouse conditions of two selected agents in three growing media</i> “. ....	123
<b>CAPÍTULO 4. Factores que afectan la capacidad de los medios de crecimiento para suprimir la Verticilosis vascular</b> .....	<b>135</b>
Abstract gráfico. ....	135
Resumen. ....	137
Artículo: “ <i>Factors that affect the capacity of growing media to suppress Verticillium wilt</i> “. ....	139
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>147</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>157</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA DE INTRODUCCIÓN GENERAL Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>161</b>



# **RESUMEN**





## RESUMEN

Las marchiteces vasculares constituyen uno de los tipos de enfermedades vegetales más importantes y estudiadas de las causadas por hongos. Los principales agentes causantes de este tipo de enfermedad son: *Fusarium oxysporum* (Schlecht ex Fries) (Fusariosis vasculares) y *Verticillium dahliae* Kleb. (Verticilosis vasculares). En la búsqueda de alternativas sostenibles, las sociedades desarrolladas generan una gran cantidad de residuos orgánicos procedentes de la industria agrícola. Estos residuos tras un proceso de compostaje podrían ser usados como sustratos hortícolas. Además, algunos composts de alta calidad o bien sustratos enriquecidos con agentes de control biológico inciden disminuyendo las enfermedades producidas por algunos de los principales hongos fitopatógenos, siendo además una alternativa al Bromuro de Metilo en los cultivos en contenedor, presentando un fenómeno denominado **supresividad**.

En este sentido, la presente Tesis Doctoral se desglosa en dos objetivos que, aunque en metodología y estructura son totalmente diferentes, tienen el estudio del control de las marchiteces vasculares como marco principal. Los objetivos son: el estudio de la diversidad y prevalencia racial de una población de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) obtenida de plantas enfermas durante los años 2004, 2005 y 2006 en la costa Noroeste de la provincia de Cádiz; y la evaluación de sustratos formulados con composts de residuos agroindustriales en cuatro patosistemas (*Fusarium*/clavel, *Fusarium*/tomate, *Verticillium*/algodón y *Verticillium*/olivo) y el estudio de los factores implicados en esos fenómenos supresivos.

*Caracterización biológica y molecular, usando técnicas filogenéticas, primers específicos de raza de Fod y test de patogenicidad, de una población de Fusarium oxysporum f. sp. dianthi obtenida en una zona con una alta tradición en el cultivo del clavel.*

El estudio poblacional caracterizó a Fod raza 2 como la más prevalente en la zona estudiada, seguida por la raza 1 u 8. Los estudios fenotípicos apuntan a que es posiblemente la raza 1 la que predomina sobre la 8. Además, las técnicas filogenéticas mostraron un buen agrupamiento racial, el cual falló cuando se usaron los primers específicos. Por otra parte, aun mostrando una alta homogeneidad intra-raza, nos encontramos aislados de Fod raza 2 sin amplificación específica de raza, altamente

virulentos, que podrían constituir un subgrupo en la población. Este estudio permitiría desarrollar programas de resistencia frente a las razas 1 y 2 de Fod con los que seleccionar cultivares que puedan reducir los efectos devastadores de la Fusariosis vascular del clavel en la zona.

*Estudio de las fracciones del carbono orgánico de la Materia Orgánica de dos sustratos formulados con compost (composts de orujo de vid [OV] y compost de corcho [CC]) y un medio conductivo estandar (fibra de coco [FC]) por Single Pulse-Magic Angle Spinning  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance (SP MAS  $^{13}\text{C}$  NMR) y las comunidades microbianas involucradas en la supresión de la Fusariosis vascular del clavel (Fod) y del tomate (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* [Fol]):*

El estudio de los grupos funcionales del carbono orgánico de los sustratos mediante Resonancia Magnética indicaron que es el nivel de hemicelulosa, y no el de celulosa, el que podría estar positivamente relacionado con los niveles de supresión a ambas Fusariosis vasculares en los tres sustratos estudiados, debido a que la celulosa podría estar físicamente protegida por lignina, no estando disponible para la degradación microbiana. Además, estos niveles de hemicelulosa podrían favorecer al mantenimiento de determinadas poblaciones microbianas involucradas en la supresión, como son *Bacillus* spp., actinomicetes oligotrofos y copiotrofos, y las relaciones actinomicetes oligotrofos/bacterias oligotrofas y actinomicetes copiotrofos/bacterias copiotrofas. El estudio de la materia orgánica de sustratos compostados supresivos usando la técnica SP MAS  $^{13}\text{C}$  NMR es altamente viable y destaca como una posible técnica predictiva debido a su carácter no destructivo.

*Selección de Agentes de Control Biológico (ACBs) aislados de dos sustratos formulados con composts (OV y CC) para controlar la Fusariosis vascular del tomate y validación en condiciones de invernadero de los dos ACBs seleccionados en OV y CC y en un sustrato conductivo estandar (FC).*

Los agentes de control biológico seleccionados (aislado A19 y aislado 305) no mejoraron la alta supresividad natural del OV frente a la Fusariosis vascular del tomate. Sólo el aislado A19 fue capaz de mejorar la supresividad del CC a niveles del OV. Ambos aislados indujeron supresividad en la FC al mismo nivel mostrado por el CC. El aislado A19 fue el único que mejoró significativamente la producción total en la FC inoculada con Fol y en el CC no inoculado con Fol respecto a los sustratos no inoculados con agentes.

*Estudio de los factores que afectan la capacidad de tres sustratos formulados con compost (OV, CC y compost de alperujo [ALP]) para suprimir la Verticilosis vascular del algodón y del olivo frente a un sustrato conductivo estándar (FC).*

Sólo el ALP se mostró supresivo frente a la Verticilosis del algodón, mientras que este compost y el OV se mostraron supresivos a la Verticilosis del olivo. El estudio concluye que el pH y la actividad  $\beta$ -glucosidasa se pueden considerar variables predictivas frente a ambas Verticilosis vasculares. En cambio, la tasa de consumo de oxígeno y la actividad fosfatasa sólo pueden ser considerados factores predictivos de la capacidad supresiva frente a la Verticilosis del algodón y del olivo, respectivamente. Prácticamente, todos los sustratos condicionaron negativamente el desarrollo de *Verticillium dahliae*, salvo el sustrato conductivo FC. Este estudio indica que el ALP es una poderosa herramienta en el control de la Verticilosis vascular del olivo en sistemas de agricultura orgánica e integrada o añadido a sustratos para la producción de plantas de olivo.



# **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. INTRODUCCIÓN. LA AGRICULTURA Y SUS PROBLEMAS FITOSANITARIOS.

Las enfermedades de las plantas han sido conocidas desde la antigüedad, pero generalmente eran atribuidas a fuerzas sobrenaturales. Hoy día se erigen como el principal factor limitante en la producción agrícola. Aparte de las plagas y las malas hierbas que afectan a las cosechas, las enfermedades están asociadas tanto a agentes abióticos como bióticos. Entre estos últimos encontramos: hongos, oomicetos, bacterias, mollicutes, virus y viroides, nematodos, protozoos y plantas fanerógamas parásitas. De ellos son los hongos y oomicetos los responsables de más de un 95% de dichas enfermedades.

Entre las principales medidas de control usadas para controlar las pérdidas causadas por las enfermedades en los cultivos se encuentran: legales, culturales, resistencia vegetal, control químico y biológico. Entre las medidas culturales y/o de control biológico podemos incluir el cultivo en contenedor (fuera del suelo) (Raviv et al., 1986; Trillas et al., 2002; Martín, 2003; Alabouvette et al., 2006; Janvier et al., 2006; Bonanomi et al., 2010). Las ventajas e inconvenientes de las principales prácticas culturales serán discutidas posteriormente con detalle en el apartado 5.1 de esta introducción.

La producción de plantas hortícolas y ornamentales en contenedor, en consecuencia, tratan de emular algunas de las propiedades del medio edáfico con vistas a desarrollar una agricultura sin suelo, la cual resulta de gran importancia en viveros (jardinería, pies para la reforestación con plantas exóticas...), así como en los cultivos de invernadero. Este tipo de producción, con el empleo de sustratos orgánicos e inorgánicos, en principio libres de patógenos (Pizano, 2001), ha experimentado un desarrollo espectacular en los últimos años por las indudables ventajas que presentan respecto a la siembra directa o a la producción de plantas en los semilleros tradicionales (Abad, 1991; Abad et al., 2004). En España, la casi totalidad de las plantas

ornamentales en macetas y las plantas hortícolas y forestales en semilleros son cultivadas en sustratos.

En este proceso productivo resulta determinante el sustrato empleado por su estrecha correlación con el desarrollo de las plantas e, incluso, con el cultivar (Raviv et al., 1986; Urrestarazu y Salas, 2004). Los sustratos orgánicos más utilizados en semilleros y en cultivo sin suelo son las turbas *Sphagnum* y la fibra de coco, debido a sus excelentes propiedades físicas y químicas (Abad et al., 2002). Pero estos sustratos tienen una serie de inconvenientes, entre los cuales destacan los más importantes: su *dependencia* de los países de origen, ya que al ser sustratos importados sus suministros están sujetos a dichos países, y su *extracción*, principalmente en el caso de la turba, que supone un grave impacto ambiental al tratarse de un recurso no renovable.

Pero el principal problema surge cuando los semilleros y cultivos hortícolas y ornamentales son también objeto de frecuentes mermas por parte de los hongos fitopatógenos del suelo. Simplemente por separar las plantas del suelo no se previene la aparición de enfermedades (Borrero, 2007). Por ejemplo, aun siendo la fibra de coco una alternativa idónea a la turba (Abad et al., 2002), su similaridad a las características microbianas de la turba la convierte también en un sustrato conductor a las enfermedades vegetales (Borrero et al., 2009; Avilés et al., 2011). En este sentido, la búsqueda de materiales locales que puedan sustituir a las turbas y a la fibra de coco, y que tengan características para evitar la infestación por patógenos vegetales, se presentan vitales.

Con el objetivo de establecer prácticas de producción agrícola sostenibles enfocadas a reducir el uso de pesticidas y llevar a cabo una explotación racional de los recursos, investigadores de todo el mundo están estudiando el desarrollo de nuevas técnicas de control biológico frente a fitopatógenos del suelo. Entre estas nuevas técnicas, adquieren especial relieve el empleo de sustratos con características supresivas (como por ejemplo, sustratos formulados a base de compost) y/o la aplicación de potenciales agentes de control biológico (obtenidos de sustratos con características supresivas), como una medida más a sumar en el control de enfermedades en cultivos en los semilleros y cultivos hortícolas y ornamentales (De Cal et al., 1994).



## 2. LAS TRAQUEOMICOSIS EN LOS CULTIVOS

Las traqueomicosis constituyen uno de los tipos de enfermedades vegetales más importantes y estudiadas de las causadas por hongos. Se entiende por **traqueomicosis** a la enfermedad de las plantas producida por hongos que invaden su sistema vascular o región traqueal, marchitándolas o desecándolas (Agrios, 1998). La característica distintiva de los hongos implicados es su restricción al xilema vegetal durante la mayor parte de su ciclo parasítico. Por ello, la marchitez constituye el síndrome más característico de este tipo de infecciones (Blanco, 1996).

Los principales agentes causantes de este tipo de enfermedad son: *Fusarium oxysporum* (Schlecht ex Fries) (Snyder y Hansen, 1940) (Fusariosis vasculares) y *Verticillium dahliae* Kleb. (Klebahn, 1913) (Verticilosis vasculares). Estos hongos fitopatógenos actúan infectando a las plantas a través de sus raíces (por las que penetran directamente) o a través de sus heridas (Agrios, 1998).

Existen numerosos ejemplos en la literatura de las pérdidas ocasionadas por las marchiteces vasculares debidas a *F. oxysporum* y *V. dahliae*. Es de destacar algunas epidemias severas que han tenido un impacto considerable en la agricultura extensiva e intensiva española, como son las Fusariosis vasculares del clavel (*Dianthus Caryophyllus* L.) y del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Tello y Lacasa, 1990) y las Verticilosis vasculares del algodón (*Gossypium hirsutum* L.) (Bejarano-Alcázar et al., 1996) y del olivo (*Olea europea* L.) (Jiménez-Díaz et al., 1998).

## 3. EL CULTIVO DEL CLAVEL Y DEL TOMATE.

### LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL CLAVEL Y DEL TOMATE

#### 3.1.- El clavel. Origen y Taxonomía. Producción en España y Andalucía.

##### 3.1.1. Origen del clavel.

El clavel es una de las más importantes flores de corte en el comercio mundial, originario de la cuenca mediterránea (Europa, Asia y África del Norte). Anteriormente

sólo existía el clavel silvestre, que tras multitud de hibridaciones y procesos de selección ha originado las variedades actuales. Los primeros claveles adaptados a la producción de flor cortada fueron seleccionados en Lyon alrededor del año 1845. A partir de 1942, William Sim obtuvo por hibridaciones y selecciones una serie de claveles que llevan su nombre "Clavel Sim" o Clavel Americano, que han dado origen al espectacular desarrollo de la producción en invernadero y bajo túneles ([www.infoagro.com/flores/flores/clavel.htm](http://www.infoagro.com/flores/flores/clavel.htm)).

### 3.1.2. *Clasificación taxonómica del clavel.*

Su clasificación taxonómica actual completa es: cellular organisms; Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Streptophytina; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; Caryophyllales; Caryophyllaceae; *Dianthus*; *D. caryophyllus* (NCBI, Taxonomy ID: 3570).

### 3.1.3. *El comercio mundial del clavel. Producción del clavel en España.*

Estados Unidos es el mayor mercado de clavel del mundo y en la actualidad Colombia es el principal proveedor y el principal productor mundial de clavel estándar. Del mercado de las importaciones norteamericanas a Colombia le siguen Ecuador y Guatemala, siendo también representativas las importaciones de Marruecos y España sobre todo en miniclavel o clavelina.

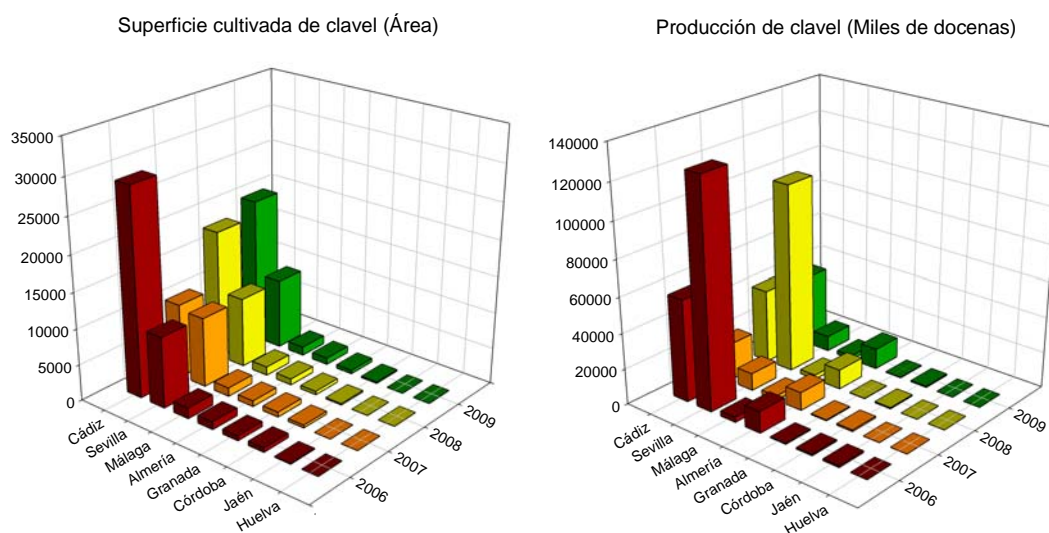
Los claveles estándar y miniclavel son de las más importantes flores de corte en el comercio mundial. Además, debido a su fácil y rápida multiplicación, son objeto de un importante comercio internacional de esquejes. En Europa, Holanda es el principal comercializador y distribuidor de clavel, destacando en los últimos años un descenso de las zonas de cultivo destinadas al clavel y la distribución de sus exportaciones.

### 3.1.4. *Producción del clavel en Andalucía.*

Andalucía, además de ser una región muy importante en la producción hortícola, juega un papel muy importante en el sector de la flor cortada (principalmente, en la

producción del clavel), suponiendo más del 50 % de la producción nacional de flor cortada en Andalucía (MARM, 2010), situándose a la cabeza de las comunidades autónomas españolas.

El cultivo de la flor cortada se inició en el Aljarafe sobre los años 70, extendiéndose posteriormente hacia la zona de la costa de Cádiz. Paralelamente, estos cultivos se fueron expandiendo también por Almería y otras zonas de la provincia de Sevilla. Las provincias de Cádiz y Sevilla aglutinan el 80% de la superficie dedicada a la flor en Andalucía (Figura 1). Según la distribución por especies, el 65% de la superficie cultivada está representada por los cultivos de clavel monoflor y miniclavel, concentrándose dicha producción en las zonas gaditanas de Chipiona y Sanlúcar de Barrameda.



**Figura 1.-** Representaciones gráficas de las medias de superficie destinada al cultivo de clavel (área) y de producción de clavel (miles de docenas) por provincias andaluzas (MARM, 2007-2010).

### 3.2. El tomate. Origen y Taxonomía. Producción en España y Andalucía.

#### 3.2.1. Origen de la tomatara.

La tomatara se encuentra entre los vegetales mayormente cultivados con una amplia producción mundial. Es uno de los cultivos vegetales más importantes debido a su fruto carnoso, el tomate, conocido como un fruto sano debido a su especial valor

nutritivo ([Dukare et al., 2011](#)). El centro de origen del género *Lycopersicon* es la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile. También en esa zona muestra *S. lycopersicum* su mayor variación. A la llegada de los españoles a América, el tomate formaba parte de los pequeños huertos de hortalizas del área mesoamericana, sin que su importancia económica fuera grande ([Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995](#)). El tomate fue introducido en España a principios del siglo XVI, junto al maíz, la patata, el chile y la batata. Se cree que llegó primero a Sevilla, uno de los entonces principales centros del comercio internacional junto con Italia.

### 3.2.2. Clasificación taxonómica de la tomatara.

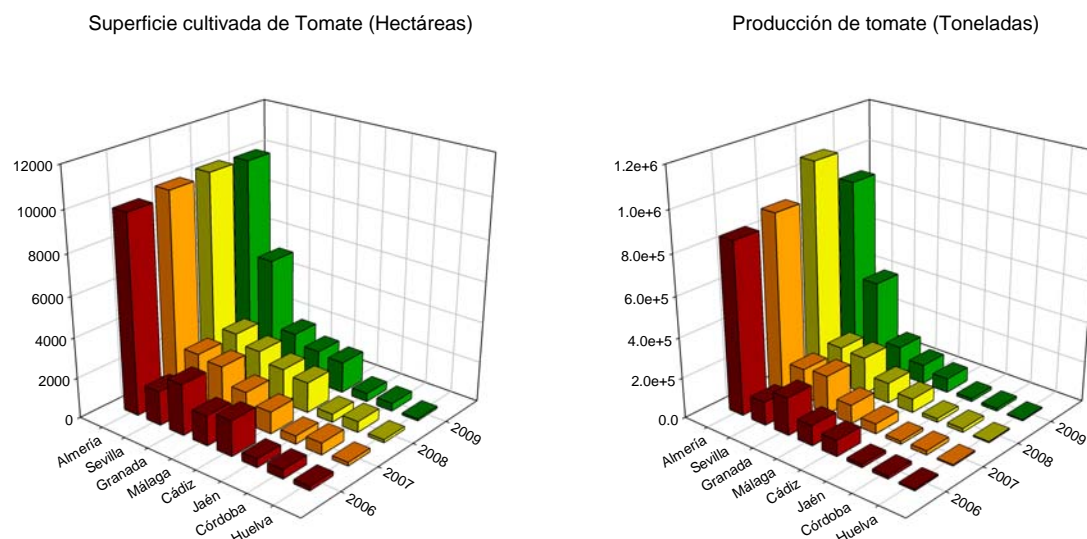
Su clasificación taxonómica actual completa es: cellular organisms; Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Streptophytina; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae; Solanoideae; Solaneae; *Solanum*; *S. lycopersicum* ([NCBI](#), Taxonomy ID: 4081).

### 3.2.3. El comercio mundial del tomate. Producción del tomate en España.

En la actualidad el comercio internacional del tomate está localizado en dos áreas concretas: China y Estados Unidos ([FAO, 2011](#)). La situación actual del mercado del tomate sitúa a España como el octavo país productor a nivel mundial y el segundo, después de Italia, a nivel Europeo, con más de 4 millones de Toneladas producidas durante 2009 ([FAO, 2011](#)).

### 3.2.4. Producción del tomate en Andalucía

Andalucía produce el 35.18% ([MARM, 2010](#)) de la producción total nacional de tomate, con 1,688.192 Toneladas. La provincia con mayor producción de tomate es Almería con ~ 54 % de la producción total regional, seguida de Sevilla y Granada (**Figura 2**). Destaca el aumento productivo de tomate en el 2009 en la provincia de Sevilla (más del doble) con respecto al resto de años ([MARM, 2007-2010](#)).



**Figura 2.-** Representaciones gráficas de las medias de superficie destinada al cultivo de tomate (Hectárea) y de producción de tomate (Toneladas) por provincias andaluzas (MARM, 2007-2010).

### 3.3. *Fusarium oxysporum*, agente causal de las Fusariosis vasculares.

Las distintas formas especiales de *F. oxysporum* son las responsables de las distintas **Fusariosis vasculares**. Los cultivos susceptibles de ser atacados por éstas incluyen plantas hortícolas como el tomate (Katan et al., 1997), la sandía (Larkin et al., 1993), el melón (Ros et al., 2005), el espárrago (Hamel et al., 2005), el guisante (Basu et al., 1976), la judía (Alves-Santos et al., 2002), ornamentales, como el clavel (Tello y Lacasa, 1990), el ciclamen (Hoitink et al., 1987), cultivos, como la palmera datilera (Elliot et al., 2010), el algodón (Abo-Elyousr et al., 2009), el tabaco (Alves-Santos et al., 2007), el rábano (Trillas et al., 1986) y el garbanzo (Singh et al., 2006), entre otros.

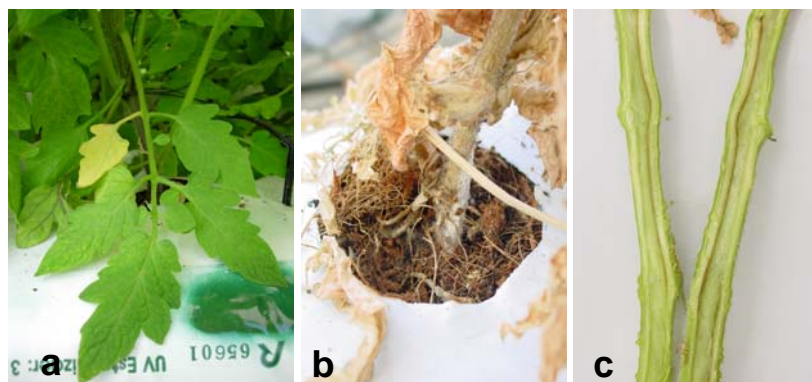
#### 3.3.1. Sintomatología general de las Fusariosis vasculares.

La Fusariosis vascular es una enfermedad caracterizada por la aparición sectorial de los síntomas de marchitez (**Figura 3a**), acompañada del amarilleamiento parcial de las hojas y el doblamiento de los brotes hacia el lado de la planta enferma, a causa de la interferencia en el crecimiento. Además, se observa enanismo en los brotes y disminución del crecimiento de la planta (Agrios, 1998).

La marchitez continúa avanzando desde las partes inferiores de la planta hacia las superiores del tallo y de la hoja. Esto provoca la interferencia con el transporte de

agua por la planta debido a la presencia de micelio y de esporas, y debido a los polisacáridos, geles o gomas que se forman por la oxidación y acumulación de productos de degradación de las células vegetales atacadas y por la formación de tilosas (Agrios, 1998). Cuando la planta se enferma adquiere un color verde grisáceo, produciendo finalmente senescencia por desecación (**Figura 3b**) (Garcés de Granada et al., 1999).

Un aspecto muy importante para el diagnóstico de la enfermedad, que la diferencia fácilmente de otras enfermedades vasculares, es una coloración blanquecina, amarillenta o marrón en los haces vasculares y el deshilachamiento de los tejidos (**Figura 3c**) sin llegar a afectar a la médula (Baker, 1980).

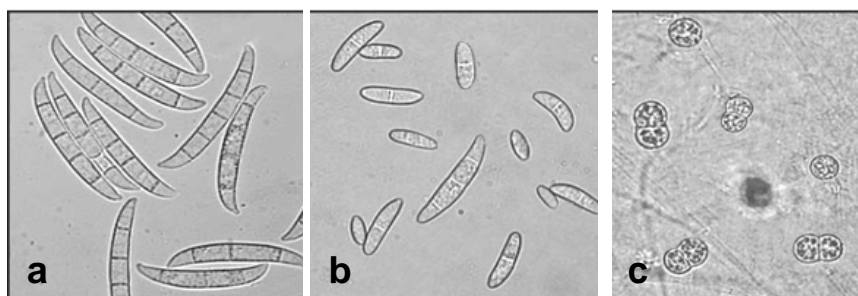


**Figura 3.-** a, desarrollo unilateral de la Fusariosis vascular del tomate; b, planta muerta con presencia de macroconidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en la base del tallo; c, corte longitudinal de una planta de tomate mostrando coloración marrón del xilema debido a la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en los vasos xilemáticos.

Aunque no se conoce el estado sexual del hongo, produce tres tipos de esporas asexuales (Nelson et al., 1983):

- las **macroconidias**, que son producidas en fiálidas sobre conidióforos simples o ramificados agregados o no en esporodoquios, con paredes delgadas, una célula basal característica en forma de pie y otra apical con el extremo agudo (**Figura 4a**).
- las **microconidias**, que son de forma diversa, desde ovals a forma de riñón, y se producen en fiálidas cortas en cuyo extremo se agregan formando a veces “cabezuelas” (**Figura 4b**).
- las **clamidosporas**, de paredes gruesas, que pueden formarse en hifas o en conidias de forma intercalar o terminal, y se desarrollan en cultivos y en el huésped en los estados

finales de la patogénesis, siendo la principal forma de supervivencia (**Figura 4c**). Las clamidosporas se encuentran libres en el suelo, o embebidas en humus o restos vegetales (Nash et. al., 1962), y germinan en respuesta a estímulos nutritivos diversos como materia orgánica fresca y especialmente a exudados de raíces de plantas huéspedes y no huéspedes (Griffin, 1969).



**Figura 4.-** Macroconidias (a), microconidias (b) y clamidosporas (c) de *Fusarium sp.* Fuente: web *Tree of the Life web project* (<http://tolweb.org/Sordariomycetes/29050>).

### 3.3.2. Definición de *formae specialis* y razas.

*Fusarium oxysporum* infecta sobre unas 100 especies botánicas, mostrando un alto grado de variación en características de cultivo y patogenicidad (Burnett, 1984). Es un hongo fitopatógeno sumamente importante que existe en numerosas formas especializadas, agrupadas en *formae specialis* (formas especiales, basándose su patogenicidad en un hospedador en particular) y *razas* (comportamiento mas o menos virulento en función de la variedad del hospedador) (Langin et al., 1995).

### 3.3.3. Fusariosis vasculares del clavel. Epidemiología, taxonomía y clasificación racial.

#### 3.3.3.1. Fusariosis vascular del clavel.

Detectado por primera vez por Prilleux y Delacroix (1899), *Fusarium oxysporum* *formae specialis dianthi* (Prillieux & Delacroix) W.C. Snyder & H.N. Hansen (Fod) es el patógeno responsable de grandes pérdidas económicas ocasionadas en el cultivo del clavel. Fue descrito por primera vez en Italia y Francia sobre los años 70 del siglo XIX (Garibaldi, 1975, 1977) y posteriormente detectado en España en 1990 en cultivos del sureste peninsular (Tello y Lacasa, 1990). En la costa noroeste de Cádiz,

los problemas de Fusariosis vascular en clavel comenzaron a aparecer sobre los años 1980 a 1982, apenas cinco años después de la introducción de las primeras plantaciones de clavel (García, 2008).

### 3.3.3.2. Clasificación taxonómica de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Su clasificación taxonómica actual completa es: cellular organisms; Eukaryota; Opisthokonta; Fungi; Dikarya; Ascomycota; saccharomyceta; Pezizomycotina; leotiomyceta; sordariomyceta; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; mitosporic Hypocreales; Fusarium; Fusarium oxysporum species complex; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (NCBI, Taxonomy ID: 42551).

### 3.3.3.3. Epidemiología de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*.

La temperatura, junto con la nutrición de la planta, son los factores ambientales que mayor influencia tienen en el desarrollo de la Fusariosis vascular del clavel (Figura 5) y en la expresión de sus síntomas (Baker, 1988; Ben-Yephet et al., 1997).



**Figura 5.-** Planta de clavel con síntomas de Fusariosis vascular. a, detalle de coloración en la base del tallo; b, planta de clavel marchita por el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

La temperatura óptima para el desarrollo del patógeno está entre 22 y 30° C. Puede desarrollarse en suelos con pH de entre 2.2 y 9.0, siendo el pH óptimo de 7.7 (Fletcher y Martin, 1972; Nelson, 1981; Tramier et. al., 1983). El hongo es aerobio y sus poblaciones se reducen en condiciones de saturación del suelo.



Los suelos ligeros y ácidos, abonados con exceso de nitrógeno, así como la escasez de potasio, favorecen el desarrollo de la enfermedad (Pape, 1977).

#### 3.3.3.4. Caracterización racial de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*.

*F. oxysporum* f. sp. *dianthi* puede ser clasificado en razas fisiológicas en base a la capacidad del patógeno para atacar a los diferentes cultivares de clavel. Pero estas interacciones planta-patógeno muestran variaciones cualitativas y cuantitativas (Garibaldi y Pergola, 1975; Garibaldi, 1983; Garibaldi y Rossi, 1987; Mitteau, 1987) y están afectadas por diversos factores, como son el tipo y nivel de resistencia y susceptibilidad del hospedador, la virulencia y agresividad del aislado, la densidad de inóculo, el mecanismo de patogénesis (Garibaldi y Gullino, 1987; Tramier et al, 1987; Baayen, 1988; Baayen et al, 1988) y las condiciones ambientales (Ben-Yephet et al., 1997).

Una primera caracterización racial clasificó a Fod en ocho razas fisiológicas (Garibaldi et al., 1975, 1977, 1983; Aloi y Baayen, 1993), encuadradas en seis grupos de compatibilidad vegetativa (Baayen et al., 1997). Hasta la fecha, diez razas han sido descritas en todo el mundo (Prados-Ligero et al, 2007), lo que refleja la notable capacidad de variación genética del hongo. Esta gran variabilidad patogénica es una de las principales y más importantes características de Fod (Andrés et al., 2001). Las razas 1 y 8 se originaron aparentemente en la Riviera Italiana, donde han sido asociadas con ecotipos Mediterráneos de clavel, encontrados en Italia, Francia y España. La raza 2 esta ampliamente dispersa en todas las áreas del cultivo de clavel del mundo. La raza 4 se encuentra principalmente en cultivares de clavel de EEUU, Italia, Israel, España y Colombia. La raza 3 fue inicialmente clasificada como una raza de Fod, en cambio, métodos recientes basados en estudios del ADN han reclasificado este patógeno como *F. redolens*, revelando que *F. redolens* y *F. oxysporum* no sólo son especies diferentes, sino que han perdido relación como grupos hermanos (Bogale et al., 2007). Tres nuevas razas fueron descritas en claveles sintomáticos de Australia (raza 9, Kalc Wright et al., 1996) y Holanda (razas 10 y 11; Baayen et al., 1997). Las razas referidas en España han sido las razas 1, 4 y 2, predominando esta última sobre las demás (Andrés et al., 2001).

### 3.3.2. *Fusariosis vascular del tomate. Epidemiología, taxonomía y clasificación racial.*

#### 3.3.2.1. Patógeno responsable de la Fusariosis vascular del tomate.

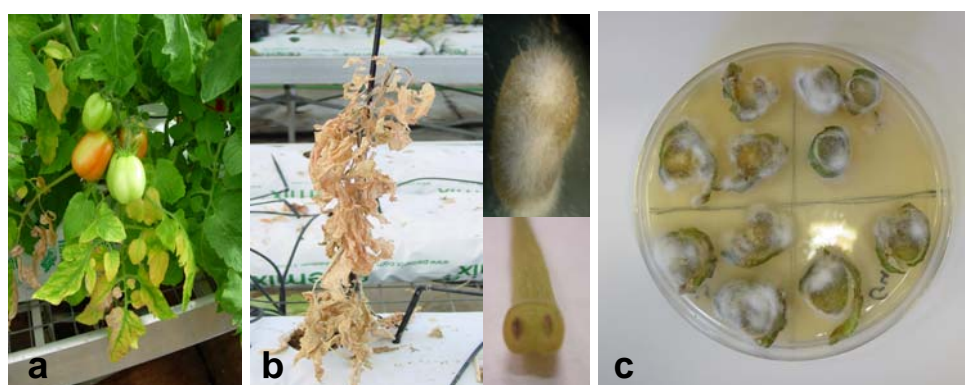
*Fusarium oxysporum* formae specialis *lycopersici* (Sacc.) **Snyder y Hansen** (Fol) es el patógeno responsable de grandes pérdidas económicas ocasionadas en el cultivo del tomate. La Fusariosis vascular del tomate se ha señalado en, al menos, 32 países, y en potencia es una de las enfermedades más graves sufridas por esta planta (Smith et al., 1992).

#### 3.3.2.2. Clasificación taxonómica de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Su clasificación taxonómica actual completa es: cellular organisms; Eukaryota; Opisthokonta; Fungi; Dikarya; Ascomycota; saccharomyceta; Pezizomycotina; leotiomyceta; sordariomyceta; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; mitosporic Hypocreales; Fusarium; Fusarium oxysporum species complex; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (NCBI, Taxonomy ID: 886597).

#### 3.3.2.3. Epidemiología de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

La temperatura del suelo y del aire son factores ambientales muy importantes en el desarrollo y la gravedad de la Fusariosis vascular del tomate (**Figura 6**).



**Figura 6.-** a, planta de tomate con síntomas de fusariosis vascular; b, planta de tomate muerta por desecación, presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en los haces vasculares de secciones de tallo de plantas de tomate; c, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en los haces vasculares de secciones del tallo de una planta de tomate.

La temperatura óptima del suelo para el desarrollo de la enfermedad es de unos 28° C. Los síntomas de la parte aérea son más graves y rápidos cuando la temperatura del aire es también de este nivel (Tello y del Moral, 1995). El hongo tolera una amplia gama de pH y se establece con facilidad en muchos tipos de suelos, que permanecen infectados casi indefinidamente. El cultivo repetido de tomate aumenta en general el riesgo de que aparezca la enfermedad. Se disemina principalmente por el suelo, por trasplantes infectados y por residuos de cosecha infectados (Marois, 1993). En cultivos sin suelo la fuente principal de contaminación es el suelo infectado que se introduce con los trasplantes, el sustrato o el agua del riego (Smith et al., 1992), sin poderse descartar el vuelo de macroconidias.

#### 3.3.2.4. Caracterización racial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Se han descrito tres razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. De las tres, la raza 1 es la más ampliamente distribuida. La raza 2, identificada en 1940 y descubierta en 1961, es más virulenta que la raza 1 sobre las tomateras localizadas el área de Levante y Andalucía Oriental, a la que ha aparentemente ha desplazado (Tello y Lacasa, 1988). En 1982 se señaló una tercera raza en Queensland (Australia) (Smith et al., 1992), que actualmente no ha sido descrita en España.

## 4. EL CULTIVO DEL ALGODONERO Y DEL OLIVO.

### LA VERTICILOSIS VASCULAR DEL ALGODONERO Y DEL OLIVO.

#### **4.1. El algodón. Origen y Taxonomía. Producción en España y Andalucía.**

##### *4.1.1. Origen del algodón.*

El algodón es un cultivo industrial de gran difusión mundial. Las fibras de su cápsula se usan para la fabricación de productos textiles. Este cultivo presenta un gran interés comercial debido a que en su procesamiento sólo se pierde un 10% de su peso. Además, también pueden extraerse aceites de su semilla (Kasem, 2002).

Las diferentes especies del algodónero son originadas en América tropical, Asia y África. Sin embargo, se ha establecido que es originario de América Central y del sur de México.

#### 4.1.2. *Clasificación taxonómica del algodónero.*

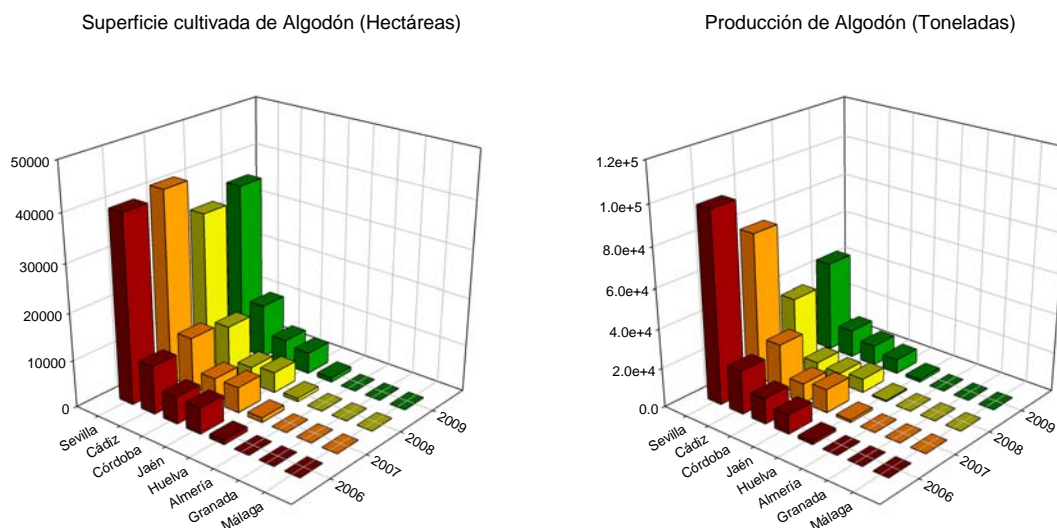
Su clasificación taxonómica actual completa es: cellular organisms; Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Streptophytina; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons; rosids; malvids; Malvales; Malvaceae; Malvoideae; *Gossypium*; *G. hirsutum* (NCBI, Taxonomy ID: 3635).

#### 4.1.3. *El comercio mundial del algodón. Producción del algodón en España.*

El principal productor mundial de algodón es China, seguida de Estados Unidos e India. En la Unión Europea el principal productor es Grecia, seguida de España. En España actualmente sólo se produce algodón en Andalucía y Murcia, destacando la región andaluza con una producción nacional del 99.74% (MARM, 2010). La producción murciana actual representa menos del uno por ciento (0.26%) de la producción total española (MARM 2010).

#### 4.1.4. *Producción del algodón en Andalucía.*

Andalucía se erige como la principal productora española de algodón en España. Las provincias andaluzas productoras de algodón son Sevilla, Cádiz, Córdoba, Jaén y Huelva (**Figura 7**). Aunque destaca principalmente la provincia de Sevilla con un 58.22%, su producción se ha visto mermada en durante los últimos años (MARM, 2007-2010).



**Figura 7.-** Representaciones gráficas de las medias de superficie destinada al cultivo del algodón (Hectárea) y de producción de algodón (Toneladas) por provincias andaluzas (MARM, 2007-2010).

## 4.2. El olivo. Origen y Taxonomía. Producción en España y Andalucía.

### 4.2.1. Origen del olivo.

La difusión del olivo se remonta a 12.000 años antes de Cristo, coincidiendo con la expansión de las civilizaciones mediterráneas. Es originario de una región geográfica que ocupa desde el sur del Cáucaso hasta las altiplanicies de Irán, Palestina y la zona costera de Siria, se extendió por Chipre hacia Anatolia, y a través de Creta hacia Egipto; en un primer momento por Griegos y Fenicios, y mas tarde por Cartagineses, Romanos y Árabes, hasta poblar todos los países ribereños del Mediterráneo. Posteriormente, en los siglos XV y XVI, con los grandes viajes transoceánicos de Colón, Magallanes y Juan Sebastián Elcano, pasó y se extendió por América. En la actualidad, ha sido introducido y cultivado en Sudáfrica, China, Japón y Australia (Civantos 2008; López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

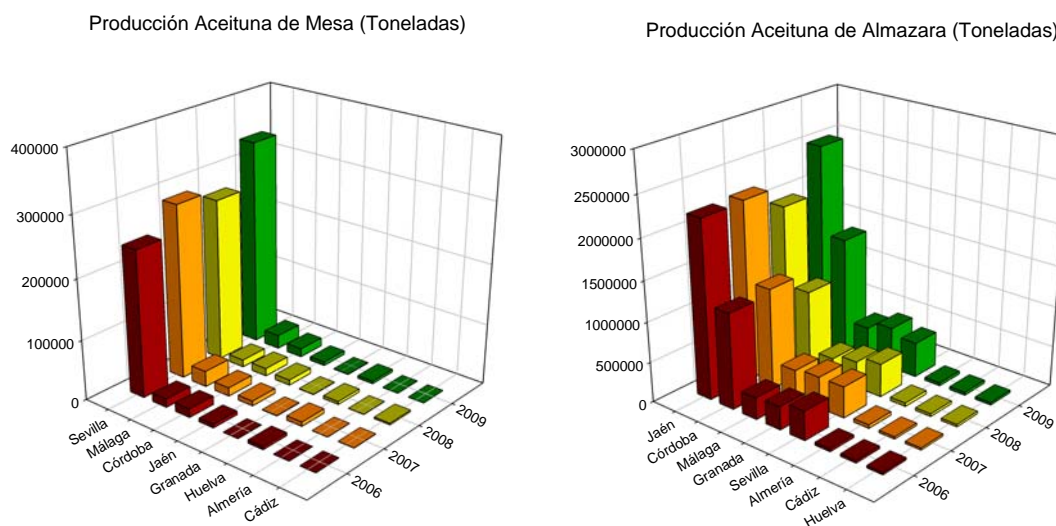
### 4.2.2. Clasificación taxonómica del olivo.

Su clasificación taxonómica actual completa es: cellular organisms; Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Streptophytina; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;

asterids; lamiids; Lamiales; Oleaceae; Oleaceae; *Olea*; *Olea europaea* (olivo silvestre) (NCBI, Taxonomy ID: 158386).

#### 4.2.3. El comercio mundial del olivo. Producción del olivo en España.

Europa se presenta como potencial mundial en la producción del olivo, encabezada por España con una producción de 7,923.000 Toneladas de aceitunas en 2009 (FAO 2009), seguida por Italia y Grecia. En España, la producción de olivo se centra en las regiones de Extremadura y Andalucía, con el 19.85% y 79.51%, respectivamente de la producción nacional en 2009 para la aceituna de mesa y un 4.4% y 83.92% para la de almazara, respectivamente (MARM, 2010).



**Figura 8.-** Representaciones gráficas de las medias de producción de aceituna de mesa y aceituna de almazara (Toneladas) por provincias andaluzas (MARM, 2007-2010).

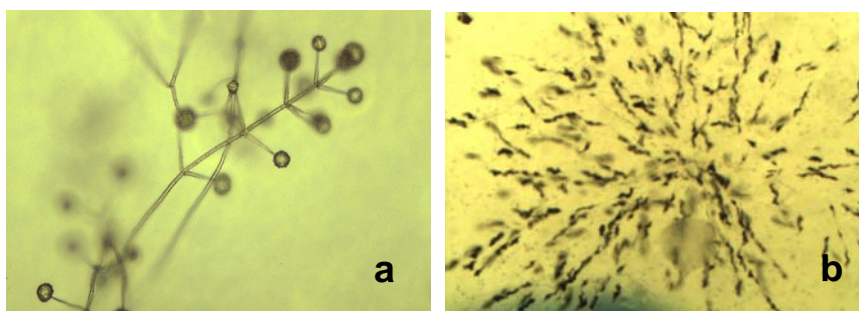
#### 4.2.4. Producción del olivo en Andalucía.

En Andalucía (**Figura 8**), la provincia de Sevilla se muestra como la mayor productora de aceituna de mesa con un 87.51% de la producción regional, mientras que son las provincias de Jaén y Córdoba quienes presentan mayores producciones de aceituna de almazara, con un 46.44% y un 26.60%, respectivamente (MARM, 2010).

### 4.3. *Verticillium dahliae*, agente causal de las Verticilosis vasculares.

El hongo *Verticillium dahliae*, relacionado evolutivamente con los ascomicetos, es el responsable de la **Verticilosis vascular**. Es un patógeno de más de 400 especies vegetales, incluyendo cultivos herbáceos hortícolas (alcachofa, pimiento,..), industriales (algodón, tabaco...), leguminosos (garbanzo, guisante...) y ornamentales (clavel, rosal y crisantemo) y cultivos leñosos frutales (pistacho, vid) (Pegg y Brady, 2002).

*V. dahliae* se caracteriza por la producción de conidióforos hialinos con fiálidas dispuestas en verticilo (**Figura 9a**). Se diferencia morfológicamente de otras especies fitopatogénicas dentro del género *Verticillium* (por ejemplo, *V. albo-atrum*) por la formación de estructuras de resistencia llamadas **microesclerocios** (**Figura 9b**). El patógeno forma sus microesclerocios en los tejidos senescentes y muertos de su huésped al final de la fase parasítica de su ciclo de vida (Wilhelm, 1955).



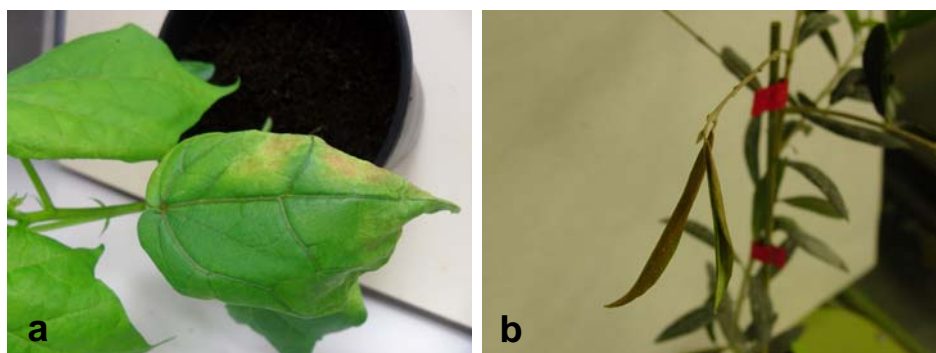
**Figura 9.-** a, disposición verticilada de las fiálidas sobre los conidióforos, genérica de las especies de *Verticillium* (fuente: <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728.html>), b, fotografía de un microesclerocio de *V. dahliae* creciendo sobre medio selectivo.

#### 4.3.1. Clasificación taxonómica de *V. dahliae*.

Su clasificación taxonómica actual completa es: cellular organisms; Eukaryota; Opisthokonta; Fungi; Dikarya; Ascomycota; saccharomyceta; Pezizomycotina; leotiomyceta; sordariomyceta; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellales; Plectosphaerellaceae; mitosporic Plectosphaerellaceae; *Verticillium* (NCBI, Taxonomy ID: 27337).

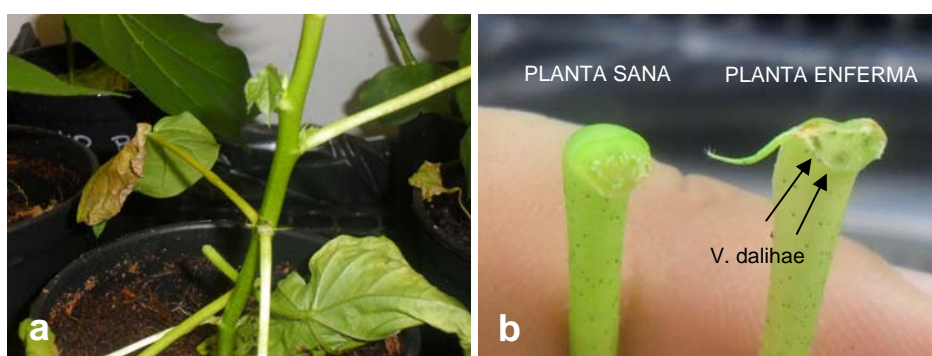
#### 4.3.2. Sintomatología de las Verticilosis vasculares.

Su patrón de síntomas depende en gran medida de la especie huésped (Blanco, 1996). Cuando *V. dahliae* invade la planta, se desarrolla creando zonas necróticas en las hojas más o menos brusca (Figura 10) que progresa de abajo hacia arriba sin manifestar gomosis externa o interna en el tallo. Si los síntomas no están muy avanzados puede ser reversible, llegando incluso a atenuarse; este síntoma se observa principalmente en el desarrollo de la verticilosis del olivo (Jiménez-Díaz, 2010).



**Figura 10.-** a, desarrollo unilateral de la Verticilosis vascular en una hoja de algodónero, con coloración oscura de los haces vasculares; b, hojas de olivo con síntomas de Verticilosis vascular.

Los síntomas comunes son epinastias y clareamientos de nervios, que pueden manifestarse a las 24-48 horas de la infección. Posteriormente, aparecen las clorosis foliares seguidas de amarillez, necrosis y defoliación, usualmente con desarrollo acróptero (Figura 11a). En los tejidos vasculares de plantas infectadas (Figura 11b), se observa generalmente una coloración vascular que ayuda al diagnóstico (Blanco, 1996).



**Figura 11.-** a, detalle de defoliación en un algodónero debido a *V. dahliae*; b, detalle de coloración oscura en los haces vasculares de un peciolo debido a la presencia de *V. dahliae*.



#### 4.3.3. *Epidemiología de Verticillium dahliae*.

*V. dahliae* es un hongo ecológicamente simbiote obligado, que desarrolla una prolongada fase parasítica circunscrita al xilema de la planta infectada (Jiménez-Díaz, 2010). Tiene escasa o nula actividad saprofitica en el suelo, en el cual sobrevive mediante microesclerocios libres o inmersos en restos vegetales (Pegg y Brady, 2002). Los microesclerocios pueden permanecer latentes en el suelo más de 10 años y su germinación se estimula principalmente por los exudados de la raíz. Las hifas infecciosas que emergen de los microesclerocios penetran en las raíces, principalmente en las áreas de diferenciación celular.

Aunque no presenta patogenicidad huésped-específica, la virulencia de sus poblaciones responde a una adaptación progresiva a las plantas huésped con las que interacciona prolongadamente (Schnathorst y Sibbett 1971a, 1971b; Jiménez-Díaz, 2010).

Otro aspecto frecuente es la existencia de infecciones asintomáticas, es decir, aislados que resultan patogénicos únicamente cuando se inoculan sobre sus huéspedes originales, aunque puede infectar sistémica y asintómicamente los huéspedes heterólogos (González Torres et al., 1988).

#### 4.3.4. *Patotipos Defoliante y No defoliante*.

La verticilosis se clasifica en dos patotipos, denominados **defoliante** (D) y **no defoliante** (ND), de acuerdo con el síndrome del mismo nombre que causan en la planta (Rodríguez-Jurado, 1993; Dervis 2007). En ambos patotipos se diferencian dos complejos sintomáticos, conocidos como *apoplejía* (o forma aguda de la enfermedad) y *decaimiento lento* (o forma crónica) (Blanco-López 1984; Jiménez-Díaz, 1998). Los patotipos D son altamente virulentos y letales, mientras que los ND son menos virulentos. Debido a la elevada virulencia, el síndrome D se caracteriza por la caída rápida y extensa de las hojas verdes asintomáticas de brotes y ramas, que pueden quedar totalmente defoliados, dando generalmente lugar a la muerte de dichos órganos o de la planta completa (Rodríguez-Jurado, 1993; Navas Cortes et al., 2008).

#### 4.3.5. *La verticilosis vasculares del algodónero y del olivo.*

La verticilosis del algodón se describió por primera vez en el algodónero americano en Virginia, EEUU. Debido a esto, la importación de plantas enfermas desde América introdujo la enfermedad en China a mediados de los años 30 (Du et al., 2002). Estudios realizados durante los años 1981 a 1985 en campos de algodóneros situados en el Valle de Guadalquivir, principal productor nacional de algodón, describen a *V. dahliae* como el principal patógeno responsable de la pérdida de más del 80 % de la producción de algodón (Bejarano-Alcázar et al., 1996).

Por otra parte, la verticilosis del olivo se describió por primera vez en Italia (Ruggieri, 1946), y posteriormente se detectó en España en 1979, en campos experimentales cerca de Córdoba (Caballero et al., 1980).

Ambos patotipos (D y ND) presentan virulencia cruzada en algodónero y olivo (Schnathorst y Sibbett, 1971a, 1971b). Así, un aislado recuperado de un algodónero o un olivo con síntomas de Verticilosis presenta virulencia cruzada en ambos cultivos.

## 5. MÉTODOS DE CONTROL FRENTE A ENFERMEDADES EN LOS CULTIVOS. CULTIVOS EN CONTENEDOR. SUSTRATOS CONDUCTIVOS A ENFERMEDADES VEGETALES.

### 5.1. **Prácticas culturales usadas frente a enfermedades en los cultivos.**

Numerosas técnicas han sido desarrolladas en el marco del control de las enfermedades vegetales. Entre las principales prácticas culturales usadas para controlar las pérdidas causadas por las enfermedades en los cultivos se encuentran:

i.- *Rotaciones de los cultivos*: Mientras que el monocultivo dirigiría a la instalación de poblaciones patógenas específicas del cultivo, las rotaciones evitan este efecto perjudicial (Janvier et al., 2007). Se considera una práctica exitosa principalmente frente a patógenos que requieren la presencia del hospedador para sobrevivir, pero no tanto para aquellos con un amplio rango de hospedadores o aquellos

aptos para crear estructuras de resistencia (Umaerus et al., 1989; Bailey y Duczek, 1996), como son el caso de *F. oxysporum* (clamidosporas) y *V. dahliae* (microesclerocios). En el caso de que un patógeno de suelo alcance niveles inaceptables, puede ser necesario considerar la aplicación de medidas dirigidas a la reducción de la densidad del inóculo en suelo.

ii.- *Siembra directa o mínimo laboreo*: La práctica de estos manejos dejan residuos de cultivos previos sobre la superficie del suelo o parcialmente enterrados en él. Estas técnicas proporciona un ambiente altamente competitivo entre microbiota residente y el patógeno (Kurle et al., 2001), influyendo sobre su capacidad patogénica. El problema surge cuando, al modificar el ambiente del suelo, un aumento en el contenido de humedad y temperatura en la capa superficial podría favorecer la supervivencia de algunos patógenos, pudiendo vivir saprofiticamente o como estructuras de resistencia en ausencia de hospedador (Rodrigues Almeida et al., 2001). Además, si los residuos vegetales se encuentran infectados por un patógeno vegetal, esta práctica preventiva se convierte en una potencial fuente de inóculo para el desarrollo de posteriores enfermedades.

iii.- *Solarización del suelo*: El objetivo original de la solarización es la reducción de la densidad de inóculo de los patógenos del suelo, pero se han expresado temores de que una recontaminación del suelo parcialmente vacío biológicamente pueda causar pérdidas mayores que si no se hubiera tratado, en ciertas situaciones (Avilés, 1998).

iv.- *Uso de variedades resistentes*: Desde fecha temprana se consideró la resistencia vegetal a la enfermedad como un método prometedor de control (Garibaldi, 1983). Sin embargo, en varias localidades, el uso de cultivares resistentes no se adapta bien a las necesidades. Además, la rápida ruptura de la resistencia por la aparición de nuevas razas o la proliferación de razas a priori no problemáticas en una zona hace que se tenga que utilizar con cierta prudencia los cultivares resistentes dentro del sistema productivo (Rodríguez-Kábana, 1997).

v.- *Uso de fungicidas y fumigantes*: Durante un largo período de tiempo, un amplio espectro de sustancias químicas (como son, por ejemplo, el Bromuro de Metilo o el Metam Sodio) han sido ampliamente usados para controlar los patógenos del suelo

(Janvier et al., 2007). Específicamente, el Bromuro de Metilo ha sido un producto muy eficaz en el control de las marchiteces vasculares, siendo ampliamente utilizado para la fumigación del suelo frente a Fusariosis (Trillas et al., 2002) y Verticilosis vasculares (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). La aplicación de fungicidas durante el desarrollo de la planta es cara y no aportando un control óptimo (Smith et al., 1992), debido principalmente a que no son específicos, destruyendo a toda microflora presente en su camino, siendo patogénica o no. Estudios dirigidos a la integración de métodos combinados de control con bajas dosis de químicos han estado estudiándose en el control de la Verticilosis vascular (Goicoechea, 2009).

Algunos de estos químicos han sido catalogados como nocivos tanto para el hombre como para el medio ambiente (Janvier et al., 2006). En 1992, en Copenhague, se realizó una reunión donde se catalogó al Bromuro de Metilo como agente causal de la destrucción de la capa de ozono. Se llegó a un acuerdo para disminuir progresivamente la aplicación de Bromuro de Metilo, hasta la prohibición total en el **Protocolo de Montreal** celebrado en el 2005 (Janvier et al., 2006). Por otra parte, muchos productos fitosanitarios utilizados en el control de estos organismos han creado resistencias en las poblaciones de agentes fitopatógenos, con un descenso en la eficacia del control, siendo necesario un desarrollo continuo de nuevos productos (Cook et al., 1996).

vi.- *Cultivos en contenedor (fuera del suelo)*: Otra alternativa es el cultivo fuera del suelo o cultivos hidropónicos, sobre sustratos orgánicos o inorgánicos normalmente libres de patógenos (Pizano, 2001).

Se denomina **sustrato** a todo aquel material sólido distinto del suelo, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular de la planta, desempeñando, por tanto, un papel de soporte para la planta. El sustrato puede intervenir o no en el complejo proceso de la nutrición mineral de la planta.

## 5.2. Cultivos en contenedor: sustratos más utilizados. Sustratos conductivos a enfermedades vegetales.

Como se ha mencionado anteriormente, los sustratos orgánicos más utilizados en semilleros y en cultivo sin suelo son las turbas *Sphagnum* y la fibra de coco. La **fibra de coco** es un subproducto de la industria del coco que se encuentra disponible en grandes cantidades en los países productores. Los subproductos resultantes del desfibrado de la nuez del coco consisten, en gran medida, en restos de fibras cortas (coconut fiber) y polvo de coco (Burés, 1997; Abad et al., 2002; Petit y Villegas, 2004).

En peso, la fibra de coco representa aproximadamente una tercera parte de la pulpa de coco. Los otros dos tercios, conocido como polvo de fibra de coco o ‘*coir dust*’, generalmente se ha considerado un material de desecho inútil. A pesar de que es biodegradable, tarda 20 años en descomponerse. Millones de toneladas de este material se disponen en pilas enormes en la India y Sri Lanka. Durante la última mitad de la década de los 80, los investigadores han desarrollado con éxito procesos de transformación de esta fibra en mantillo, tratamiento del suelo y medios de crecimiento hidropónico, utilizándose como alternativa a materiales como la turba y la vermiculita (Petit y Villegas, 2004).

Se trata, por tanto, de un material que presenta unas propiedades físico-químicas muy adecuadas para el cultivo (Abad et al., 2002). Entre estas propiedades destacan la elevada capacidad de retención de agua, un bajo contenido en nutrientes y su excelente pH (5,98). Aunque su salinidad puede ser muy alta, en realidad podemos encontrar muestras de todo el mundo, donde existe una variación entre 0,39 y 6,77 dS/m (Abad et al., 1996).

Pero el principal problema que presentan tanto la turba como la fibra de coco es que son **sustratos conductivos** para las enfermedades de las plantas (Borrero et al., 2004). En búsqueda de alternativas sostenibles, las sociedades desarrolladas generan una gran cantidad de residuos orgánicos procedentes de la industria agrícola. Estos residuos tras un proceso de compostaje se podrían usar como sustratos hortícolas. El

coste de producción de estos sustratos podría ser inferior a los de extracción e importación de turba y de fibra de coco. Además, los costes de producción para el horticultor también podrían disminuir, ya que de forma natural algunos composts de alta calidad (Hoitink et al., 1977; Trillas et al., 1986; Chen et al., 1988b; Pera y Calvet, 1989; Gorodecki y Hadar, 1990; Craft y Nelson, 1996) o bien enriquecidos con agentes de control biológico (Trillas et al., 2006; Sant et al., 2010; Dukare et al., 2011) inciden disminuyendo las enfermedades producidas por algunos de los principales hongos fitopatógenos, siendo además una alternativa al Bromuro de Metilo en los cultivos en contenedor, presentando un fenómeno denominado **supresividad**.

## 6. SUPRESIVIDAD. SUELOS O SUSTRATOS SUPRESIVOS

El suelo (o sustrato) se considera un ente vivo, sede de interacciones complejas donde el patógeno, enfrentado al conjunto de la microflora y microfauna, debe vencer una serie de fuerzas antagonistas para mantenerse vivo y ser capaz de infectar al hospedador (Tello y Bello, 1994). En cambio, existen suelos en los cuales no pueden manifestarse ciertas enfermedades vegetales, pese a tener simultáneamente la presencia del patógeno, del hospedador sensible y un aparente entorno favorable para el desarrollo de la enfermedad (Rodríguez-Kábana y Clavet, 1994).

De forma general, un **suelo (o sustrato) supresivo** es aquel donde cierta enfermedad está ausente u ocurre en menor grado cuando introducimos un patógeno natural o artificialmente. El patógeno introducido puede o no establecerse. Si se establece puede no producir enfermedad o bien la causa, pero ésta es menor a la registrada en otro suelo o sustrato (testigo) en las mismas condiciones (Schroth y Hancock, 1981). Así, se denomina sustrato conductivo al que carece de supresividad (Huber y Schneider, 1982).

El fenómeno de la supresividad en suelos es conocido desde hace más de un siglo (Huber y Schneider, 1982). Sin embargo, ha sido en los últimos treinta años cuando se ha estudiado en profundidad, intentando aclarar los mecanismos que la sustentan.

## 7. LOS SUSTRATOS ORGÁNICOS COMPOSTADOS. EFECTOS SUPRESIVOS FRENTE A LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

### 7.1. El Compostaje. El proceso de compostaje. Estabilidad y maduración de un compost.

#### 7.1.1. *El compostaje. Definición.*

Debido a los inconvenientes, previamente mencionados, relativos al empleo de turbas y fibra de coco, se inició hace años una búsqueda de residuos orgánicos que, convenientemente compostados, se pudieran emplear como sustrato o componentes de sustratos hortícolas.

El **compostaje** es una tecnología de bajo coste que permite transformar residuos y subproductos orgánicos en materiales biológicamente estables que pueden utilizarse como enmendantes y/o fertilizantes y como sustratos para cultivo sin suelo, disminuyendo el impacto ambiental de los mismos y posibilitando el aprovechamiento de los recursos que contienen. El proceso es una oxidación llevada a cabo por microbios que finalmente genera dióxido de carbono, agua, minerales y una materia orgánica estabilizada denominada compost, con ciertas características húmicas y libre de compuestos fitotóxicos y agentes patógenos (Zuconi y de Bertoldi, 1987).

#### 7.1.2. *El proceso de compostaje*

El **proceso de compostaje** ha sido definido como un proceso bio-oxidativo complejo que se desarrolla sobre residuos orgánicos en estado sólido, en condiciones de humedad adecuadas, por la acción de numerosos y variados microorganismos (Abad et al., 2004). El proceso es la consecuencia de la compleja acción de las comunidades microbianas residentes o colonizadoras sobre la materia orgánica presente en el sustrato, en condiciones de aerobiosis, como principal condición (Avilés y Tello, 2001), y suficiente humedad.

Al considerarse un proceso dinámico, éste puede ser clasificado en tres fases. Estas tres fases del proceso de compostaje tienen un rango de duración de unas pocas semanas a varios meses, dependiendo del material que se esté compostando. A continuación se muestra una revisión global de los acontecimientos destacables que ocurren en cada una de las fases del proceso de compostaje (Chen e Imbar, 1993):

#### 1.- Fase inicial o Fase mesofílica:

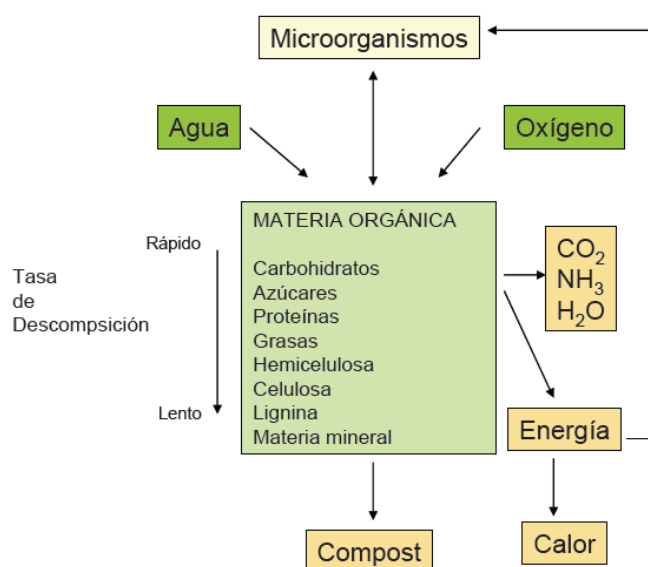
Es una fase corta, de aproximadamente 1 a 2 días de duración (Chen e Imbar, 1993; Avilés y Tello, 2001). Durante esta fase, las temperaturas incrementan rápidamente, hasta aproximadamente los 40 °C, durante la utilización de los azúcares y de otras sustancias fácilmente biodegradables (Figura 12). Durante la degradación, la producción de ácidos orgánicos conduce a una disminución del pH. Son los microorganismos mesofílicos referidos generalmente como *descomponedores primarios* (hongos y bacterias acidificantes) quienes comienzan el proceso de descomposición de los componentes fácilmente degradables. Se ha demostrado que el número de organismos mesófilos en el sustrato original es de tres órdenes de magnitud superior al del número de organismos termófilos (Insam y Bertoldi, 2003). Los microorganismos aumentan su metabolismo desprendiendo calor (Figura 12), lo cual conduce a un aumento de la temperatura del residuo en compostaje (Chen e Imbar, 1993).

#### 2.- Fase termófila:

Su duración variable, de varias semanas o incluso meses, depende del contenido de celulosa o hemicelulosa del material de partida (Avilés y Tello, 2001). En esta fase la temperatura prevalece entre los 40-70 °C (Chen e Imbar, 1993), tomando el control las estirpes termofílicas y termotolerantes. Cuando la temperatura alcanza los 60 °C, los hongos termófilos, principales responsables de la descomposición de la celulosa y hemicelulosa, cesan su actividad. Posteriormente, la descomposición se lleva a cabo principalmente por termófilos actinomicetos y bacterias formadoras de esporas. Bacterias termofílicas parecen dominar al comienzo de esta fase de alta actividad. Los agentes de biocontrol predominantes en este grupo incluyen estirpes de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Pantoea* spp. (Finstein y Morris, 1975; Boehm et al., 1997; Kwok et al., 1987; Cohen et al., 1998). Los actinomicetos termófilos predominan posteriormente (Nakasaki et al., 1985). Las sustancias fácilmente degradables, como los carbohidratos no celulósicos (azúcares, almidón) y las proteínas son rápidamente consumidas por las



bacterias termófilas. Debido a la liberación de amonio tras la degradación proteica, el pH se vuelve alcalino (Chen e Imbar, 1993). También son susceptibles a ese ataque las fracciones de lípidos y hemicelulosas; en cambio, se muestran resistentes a su acción la celulosa y la lignina (Figura 12) (Poincelot, 1972). Una gran parte de patógenos vegetales y humanos son destruidos (Chen e Imbar, 1993; Noble y Roberts, 2004), además de semillas de malas hierbas y, desafortunadamente, microorganismos beneficiosos, como fijadores de nitrógeno y algunos con capacidad de biocontrol (Hoitink y Boehm, 1999).



**Figura 12.-** Esquema representativo de los procesos involucrados durante las fase del compostaje de un residuo (Moreno y Mormeneo, 2007).

### 3.- Fase de enfriamiento:

A medida que la concentración de los productos fácilmente biodegradables se va agotando, volviéndose limitantes para la microflora (Hoitink y Boehm, 1999), la tasa de degradación disminuye, disminuyendo la actividad microbiana. Como consecuencia, se inicia un enfriamiento lento que permite la recolonización de la pila por los hongos termófilos, que prosiguen la degradación de la fracción celulósica y hemicelulósica (Chen e Imbar, 1993; Avilés y Tello, 2001).

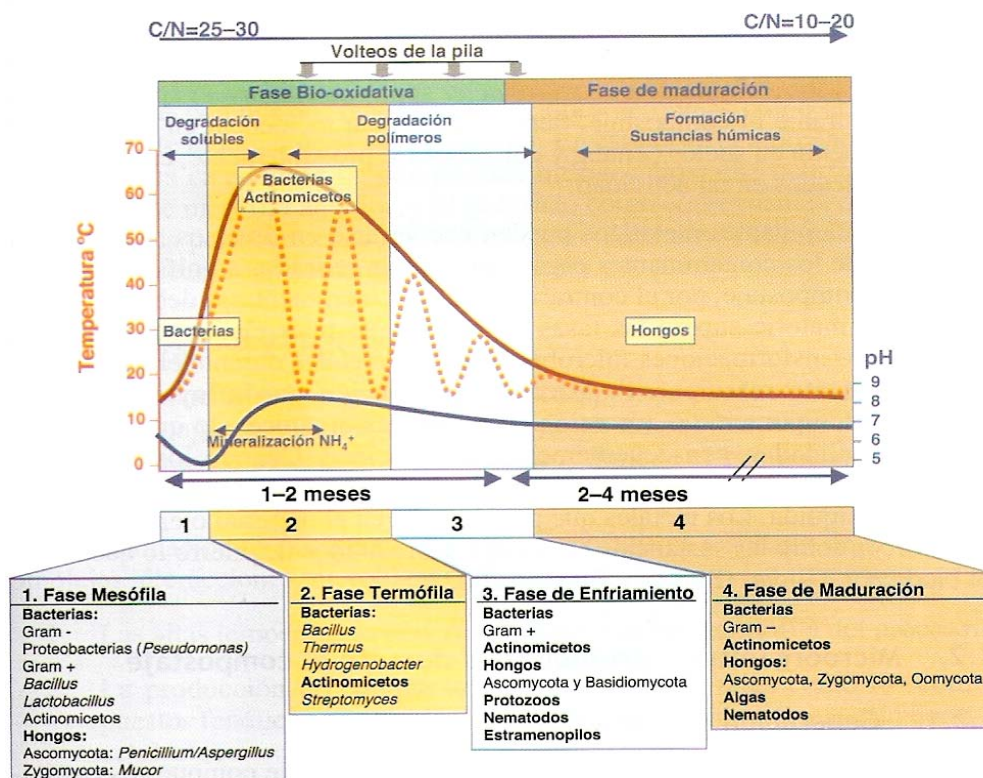
Cuando la temperatura disminuye por debajo de los 40 °C, los microorganismos mesófilos colonizan el nuevo semipasteurizado compost desde las capas más externas hacia el interior de la pila. Los organismos termófilos disminuyen. Los hongos mesófilos utilizan la celulosa y hemicelulosa, pero con menor eficiencia en su degradación que los termófilos (Avilés y Tello, 2001). Tras 18-24 h comenzada la fase de enfriamiento, las bacterias oligotrofas alcanzan picos poblacionales. Posteriormente, se inicia un ataque lento a los polímeros complejos (ligninas y suberinas).

Algunos autores destacan la importancia, en esta fase, de un frecuente volteo y un adecuado mantenimiento de las condiciones óptimas de humedad durante el proceso, ya que potencia la recolonización por mesófilos y el desarrollo de supresión natural a la enfermedad (Hoitink et al., 1991; Hoitink y Boehm, 1999; Avilés y Tello, 2001).

Aunque no se considera una fase en sí, algunos autores añaden una cuarta y última fase al proceso de compostaje, denominada **fase de maduración** (Chen e Imbar, 1993). Durante el tiempo que dura la fase se genera menos calor y el pH se vuelve por lo general ligeramente alcalino. En esta fase, numerosos pasos sucesivos de cambio de composición conducen a alteraciones en la comunidad microbiana residente. Generalmente, la proporción de hongos incrementa, mientras que la de bacterias disminuye (Insam y Bertoldi, 2003). En la **Figura 13** se muestra un resumen gráfico del proceso de compostaje, desde diversos puntos de vista (físicos, químicos y microbiológicos).

### 7.1.3. Estabilidad y maduración de un compost para su empleo como sustrato vegetal.

Se denomina **compost maduro** a aquel compost suficientemente estabilizado como para ser empleado como sustrato. El grado de descomposición es crucial para que no presente condiciones fitotóxicas, no siendo estrictamente necesario si se emplea como enmendante de suelo (Iglesias et al., 2007). Consecuentemente, el tipo de material compostado y el tiempo de compostaje condicionan el grado de descomposición. Un compost poco maduro o en proceso de maduración presenta altos niveles de actividad microbiana, condicionando la disponibilidad y la obtención de nutrientes y/o recursos esenciales por parte de la planta (Chen e Imbar, 1993), además de deficiencia de oxígeno en las raíces por el elevado requerimiento de O<sub>2</sub> (Chen e Imbar, 1993).



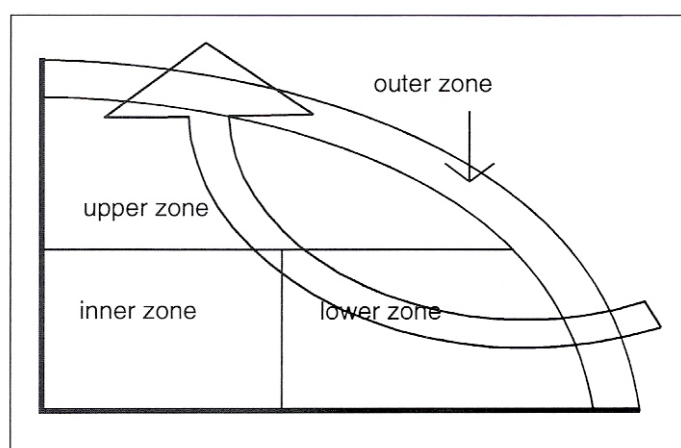
**Figura 13.** Sucesión microbiana y ambiental durante el compostaje (Moreno y Mormeneo, 2007).

Por el contrario, un compost excesivamente maduro podría presentar un ambiente extremo (excesivo nivel de sales, malas propiedades físicas, etc...) que determinará su capacidad para proporcionar nutrientes tanto a la microbiota residente (beneficiosa o perjudicial) como a la propia planta.

La naturaleza química del proceso de descomposición y la evaluación de la madurez de un compost son altamente complejos, debido a que numerosos parámetros son requeridos para proporcionar una evaluación definitiva para la buena disposición del material para su uso en horticultura (Chen e Imbar, 1993). Entre los principales cambios que tienen lugar en la fase sólida de la Materia Orgánica durante la descomposición de suelos o composts están: incremento en el contenido de cenizas, decremento de la relación C/N, incremento en la capacidad de intercambio cationico y decremento en las concentraciones de celulosa y hemicelulosa, lo cual conduce esto último a un incremento en las concentraciones de lignina (Inoko, 1982; Chen e Imbar, 1993). Por lo tanto, el componente último presente al final de un proceso de compostaje,

debido a su resistencia a la descomposición, es la lignina, constituyendo el grueso de la materia orgánica en un compost maduro (Golueke, 1972; Insam y Bertoldi, 2003).

Como se ha descrito anteriormente, la microflora presente en los composts cambia drásticamente durante el proceso de maduración (Insam y Bertoldi, 2003). Consecuentemente, diferentes zonas de las pilas de compostaje, según su temperatura, presentan diferentes microfloras con capacidades variables en la supresión a enfermedades vegetales. Desde un punto de vista microbiológico, se han identificado 4 zonas diferentes dentro de una pila (**Figura 14**) durante la fase termofílica.



**Figura 14.-** Representación esquemática de un corte longitudinal de una pila de compost, donde se indican las zonas más importantes y se representa con una flecha la corriente de convección (Insam y Bertoldi, 2003).

Además, la propia composición del material compostado y el ambiente que rodea a la planta de compostaje influyen enormemente en la riqueza, diversidad y composición de género de microorganismos que lo colonicen (Hoitink y Boehm, 1999; Avilés y Tello, 2001). Por ejemplo, composts preparados con sustancias lignocelulósicas, como corteza de árboles, son colonizados principalmente por *Trichoderma* spp. (Kuter et al., 1983), género numerosamente referenciado como potencial agente de control biológico frente a diversas enfermedades vegetales (Kwok et al., 1987; Hjeljord y Tronsmo, 1998; Duffy et al., 1997; Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004; Segarra et al., 2007; Vinale et al., 2008).

Finalmente, previo al uso como sustrato vegetal, la incubación controlada (a 20-30° C y al 40-50% de humedad) durante unas dos semanas homogeniza química y

biológicamente la muestra, mejorando el crecimiento vegetal y sus efectos supresivos (Avilés y Tello, 2001).

## 8. RESIDUOS AGROINDUSTRIALES Y SU APROVECHAMIENTO COMO SUSTRATOS HORTÍCOLAS

Entre los residuos orgánicos, susceptibles de reciclaje para la preparación de sustratos mediante la técnica del compostaje, los constituyen la mayoría de los residuos agrícolas, ganaderos, agroalimentarios y urbanos que son una materia prima renovable con una alta disponibilidad (Raviv et al., 1986; Chen y Hadar, 1987; Chen et al., 1988b). Algunos de los sustratos procedentes de los residuos agroindustriales más importantes en España son el compost de orujo de vid, el compost de corcho y el compost de alperujo.

El **orujo de vid** proviene de las industrias alcoholeras, entendiéndose por orujo el producto residual obtenido una vez prensada la uva de transformación y extraída en la alcoholera (**Figura 15**). Está formado por las semillas, la raspa o raspón y la piel de la uva. La proporción de cada constituyente puede variar según la variedad, maduración, grado de prensado y tratamientos industriales sufridos (Burés, 1997).



**Figura 15.-** a, restos de uvas; b, detalle de compost de orujo de vid.

Este material presenta un aspecto físico granular. Las partículas de diámetro inferior a 0,5 mm representan en general un porcentaje muy bajo. El orujo, pues,

presenta una buena estructura y porosidad; su salinidad es alta, 0,83 dS/m, pero no es necesario lavarlo previamente a su uso, su pH es óptimo (7,7) y además tiene una elevada capacidad de intercambio catiónico (Burés, 1997). No es aconsejable utilizar orujo de vid no compostado, ya que durante su degradación se liberan compuestos tánicos fitotóxicos, que pueden influir negativamente en el desarrollo de las plantas.

El **corcho** es el tejido vegetal producido por la base suberofelodérmica del alcornoque (*Quercus suber L.*) (Figura 16). Éste se extrae manualmente, el de mayor calidad se destina a la fabricación de tapones y el resto se utiliza para aglomerados. La capa externa rugosa más las partículas pequeñas que no son útiles son los residuos o subproductos, siendo entre un 5-20 % del total de corcho manipulado (Montoya, 1988; Moreno, 1994).

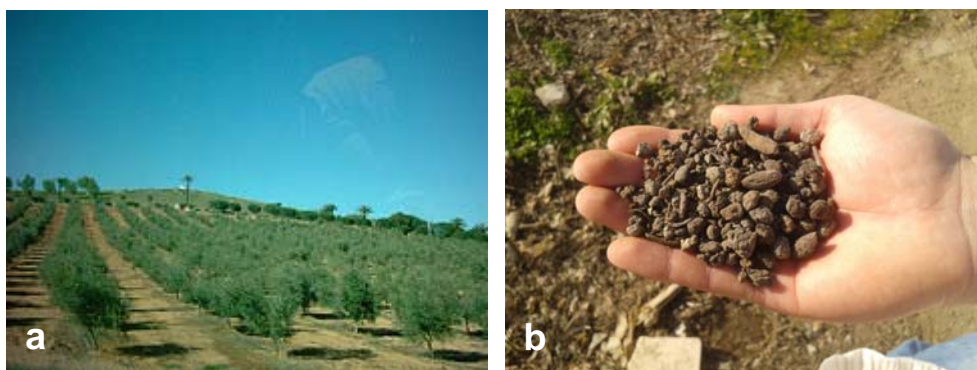


**Figura 16.-** a, alcornoque sin corteza (fuente: <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/tajofiguras/parquenat.htm>); b, detalle de compost de corcho.

En cuanto a sus propiedades químicas, es un material que tiene un pH entre 6 y 6,5, una baja conductividad eléctrica (0,35 dS/m) y con una relación C/N inferior a la que poseen otros sustratos elaborados a partir de residuos forestales (Moreno, 1994). Aunque estos residuos pueden utilizarse en mezclas como sustratos de cultivo, al tratarse de un producto orgánico, difícilmente se puede usar directamente como sustrato sin haber sufrido previamente un proceso de compostaje, para estabilizar su materia orgánica, higienizarlos y eliminar posibles problemas de fitotoxicidad.

El **alperujo** es el contaminante residuo resultante de la extracción del aceite de oliva, que está formado por la pulpa de la aceituna, el agua del fruto (alpechín) y el

hueso triturado, que puede ser separado dado su aptitud como combustible (**Figura 17**). El alperujo en fresco suele tener un pH entre 5,5 y 6 y una conductividad eléctrica aproximada de 1 dS/m. Una vez compostado, su pH se sitúa alrededor de 8, presentando una porosidad de entre el 70 y el 80%, una elevada retención de agua y una escasa aireación (Burés, 1997).



**Figura 17.-** a, olivar típico de Andalucía (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011); b, detalle de compost de alperujo.

Existen numerosos tipos de sustratos a base de composts utilizados como sustratos supresivos frente a enfermedades de origen edáfico. Una reciente revisión escrita por Avilés et al. (2011) se presenta como un excelente recurso bibliográfico sobre los principales composts estudiados, patógenos del suelo, principales efectos y referencias de grupos que estudian composts frente a enfermedades vegetales.

## 9. TIPOS DE SUPRESIVIDAD Y MECANISMOS DE ACTUACIÓN.

### 9.1. Tipos de supresividad

La supresividad de un suelo puede clasificarse siguiendo varias pautas (Garibaldi, 1983):

Según el origen del suelo en estudio, la supresividad de un suelo se puede clasificar en *Natural*, si está ligada frecuentemente a las características físicas, químicas y biológicas del sustrato, sin tener en cuenta la mano del hombre; relativamente estable

e independiente del tipo de cultivo, o *Inducida*, si la supresión proviene de una serie de prácticas culturales o introducción de agentes biológicos.

Según el espectro de organismos que contribuyan a la supresividad se puede clasificar en supresividad general o específica (Baker y Cook, 1974; Garibaldi, 1983; Hoitink et al., 1991; Hoitink et al., 1993a, 1993b; Boehm, 1997).

La **supresividad general** se aplica cuando la supresión de la enfermedad se debe a la actividad de distintos grupos de microorganismos que son capaces de actuar como agentes de control biológico. Los propágulos de determinados patógenos necesitan de fuentes exógenas de carbono como semillas y exudados de raíces para germinar e infectar (Nelson, 1983). Sin embargo, estos propágulos son sensibles a la microbiostasis (competencia y antibiosis) (Lockwood, 1988), es decir, la actividad de la biomasa microbiana existente en un suelo determina la disponibilidad de nutrientes para el patógeno debido a la competencia nutricional. Un ejemplo de enfermedades suprimidas de esta forma son las causadas por *Pythium* y *Phytophthora* spp. (Chen et al., 1988a; Mandelbaum y Hadar, 1990; Hardy y Sivasithamparam, 1991a, 1991b, 1995).

La **supresividad específica** se aplica cuando la presencia de uno o unos pocos tipos de microorganismos pueden explicar la supresión de un patógeno o de la enfermedad que cause. Un caso de la supresión específica son los microorganismos que producen antibiosis o los que inducen resistencia a la planta hacia algún patógeno. Así, se puede inducir supresividad por introducción de determinados antagonistas seleccionados a suelos o sustratos (Baker y Chet, 1982; Lewis y Papavizas, 1991; Campbell, 1994), existiendo una relación directa entre la supresividad, la actividad y la composición de la microflora del sustrato (Tuitert et al., 1998).

A diferencia de la supresión general, en la supresividad específica podemos obtener el agente o agentes causantes de supresión e inocularlo a otro sustrato, consiguiendo así un sustrato supresivo a la enfermedad específica que produzca este patógeno (Baker y Cook, 1974). Además, la supresividad específica puede ser transferida a otro suelo añadiendo una pequeña cantidad de suelo supresivo. Por otra parte, la supresividad general se reduce pero no se elimina con fumigación de suelo, y generalmente perdura tras un tratamiento a 70 °C de calor húmedo. Sin embargo, en



muchos ejemplos de supresividad específica, será eliminada por pasteurización (Weller et al., 2002).

## 9.2. Mecanismos de actuación.

Respecto a los **mecanismos de actuación**, las comunidades microbianas contribuyen a la supresión a través de cuatro principales mecanismos de control biológico: competición, antibiosis, parasitismo/depredación y resistencia sistémica inducida (Hoitink y Boehm, 1999). Numerosos mecanismos supresivos de actuación frente a enfermedades pueden operar a la misma vez contra diferentes patógenos en composts o sustratos enmendados con composts.

Estos mecanismos de acción serán posteriormente desarrollados con detalle en el apartado 10.3.1 de esta introducción.

## 10. FACTORES QUE AFECTAN A LA SUPRESIVIDAD DE LOS SUSTRATOS ELABORADOS A BASE DE COMPOSTS. FACTORES QUÍMICOS, FÍSICOS Y BIOLÓGICOS.

La cantidad de residuos orgánicos que se pueden reciclar mediante el compostaje para su uso como sustrato, abono o enmienda, es amplia. La capacidad de supresión de los composts depende de un conjunto de interacciones entre factores abióticos y bióticos que afectan a la capacidad del patógeno de causar enfermedad (Hoitink et al., 1993a, 1993b; Hoitink y Boehm, 1999). Por lo tanto, para caracterizar y analizar la naturaleza de la supresividad de las enfermedades causadas por agentes fitopatógenos del suelo se precisa estudiar su composición física, química y microbiológica (Hoitink et al., 1997).

Los parámetros abióticos se refieren a las propiedades fisico-químicas de los sustratos que pudieran tener algún tipo de relación con la supresividad a las enfermedades vegetales. Durante las últimas dos décadas se han realizado numerosas revisiones acerca de la influencia de estas propiedades fisico-químicas en la reducción de la incidencia a enfermedades (Höper y Alabouvette., 1996; Noble y Coventry, 2005; Alabouvette et al., 2006; Janvier et al., 2007; Bonanomi et al., 2010). Sus conclusiones

destacan la dificultad en la caracterización de estas influencias, debido a la complejidad de las interacciones entre las propiedades del suelo. Además, la mayoría de los parámetros se analizan independientemente, mientras que los parámetros abióticos deben ser tenidos en cuenta de manera conjunta mediante el uso de análisis multivariados (Borrero et al., 2004; Pérez-Piqueres et al., 2006; Janvier et al., 2007).

Entre los factores físicos y químicos más estudiados nos encontramos:

### 10.1. Factores físicos

La distribución proporcional de los diferentes tamaños de partículas minerales caracteriza la **textura de un suelo** determinado, la cual ha sido relacionada con la supresividad (Boehm et al., 1997; Janvier et al., 2007). Los tamaños de las partículas minerales y la proporción relativa de los grupos por tamaños varían considerablemente entre los suelos, la cual afecta directamente a la **capacidad de aireación**.

La capacidad de aireación, además de afectar directamente al crecimiento vegetal, tiene un marcado impacto sobre la severidad de las podredumbres de raíz. Respecto a *Fusarium*, la fusariosis del tomate se ve inducida por una mala aireación, mientras que la combinación de una buena aireación y una buena disponibilidad de agua resultan óptimas para la reducción de esta enfermedad (Frank et al., 1991).

La adición de arena para reducir la capacidad de aireación a sustratos a base de corteza de pino anuló el efecto supresivo a *Phytophthora* spp (Spencer y Benson, 1982). Höper et al. (1995) encontraron una correlación negativa entre el contenido de arena de un suelo y su supresividad a la Fusariosis vascular del lino. Por el contrario, no se encontraron relaciones significativas entre la textura del suelo y la fusariosis vascular del platanero (Domínguez et al., 2001) y la podredumbre radical por *Fusarium* de espárrago (Hamel et al., 2005).

El tipo de arcilla también juega un papel importante, e interacciona con las poblaciones de microorganismos que favorecen la supresividad a las fusariosis (Alabouvette, 1999) y otras enfermedades (Janvier et al., 2007). Aplicaciones de materiales arcillosos a un suelo conductivo mostró una relación positiva con las

densidades microbianas y la supresividad a la fusariosis vascular (Höper et al., 1995). Altos contenidos de arcilla han sido también asociados a la supresividad frente a *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* en trigo (Duffy et al., 1997). Por el contrario, altos contenidos en arcilla han sido también documentados en suelos susceptibles a *Phytophthora lycopersici* en tomate (Workneh et al., 1993).

El **potencial hídrico** del medio afecta la incidencia de hongos patógenos, principalmente los de la familia *Pythiaceae* (Hardy y Sivasithamparam, 1991c; Hoitink, y Kuter, 1986). Como estrategia de control, se plantea la obtención de condiciones adversas a la zoosporangiogénesis, inhibida cuando el medio está sometido a leves potenciales negativos (Duniway, 1979; Wilcox y Miretich, 1985). Uno de los componentes del potencial hídrico, el **potencial mátrico**, ha sido estudiado en un sustrato supresivo a base de corteza de eucaliptos por su posible efecto sobre la producción de esporangios, oosporas y clamidosporas por distintas especies de *Phytophthora* (Hardy y Sivasithamparam, 1991c)

## 10.2. Factores químicos.

El **pH**, es un parámetro químico que condiciona fuertemente el micocosmos presente en los sustratos. Por ejemplo, mientras que las bacterias prefieren un pH cercano a la neutralidad, los hongos se desarrollan mejor en un ambiente ligeramente ácido (de Bertoldi et al., 1985). Además, El pH del sustrato es un factor determinante en la severidad a la fusariosis vascular, ya que está asociado a la disponibilidad de macro y micronutrientes importantes para el crecimiento, esporulación y virulencia de *F. oxysporum* (Jones et al., 1989).

Un pH alto reduce la disponibilidad de nutrientes como P, Mg, Mn, Cu, Zn y Fe en sustratos orgánicos (Handreck y Black, 1991), haciendo al patógeno menos activo (Woltz y Jones, 1981; Pegg y Brady, 2002). Un manejo de la fertilización aumentando el pH por encima de 7 y controlando la disponibilidad de nutrientes puede permitir obtener un control eficiente de la enfermedad (Jones y Woltz, 1981). Estos nutrientes minerales, entre otros, afectan la virulencia de *F. oxysporum* y también a la susceptibilidad del huésped (Jones y Woltz, 1981; Duffy y Défago, 1999).

Estudios sobre la supresión de la Verticilosis vascular en berenjena, usando turba enmendada con compost, mostraron una correlación positiva entre el pH y la supresividad (Termorshuizen et al, 2006). Por otro lado, el desarrollo de la Verticilosis vascular del antirrino se ha visto también afectado por el pH, siendo la severidad de la enfermedad mayor en suelos alcalinos respecto a suelos ácidos (Dutta, 1981).

La **conductividad eléctrica** de los composts, medida que depende de la cantidad de sales disueltas presentes en un líquido, proporciona un índice de salinidad de los mismos. Composts muy salinos favorecen las enfermedades causadas por *Pythium* y *Phytophthora* (Hoitink et al., 1997; Noble y Coventry 2005). Respecto a *Fusarium* se ha visto que el aumento en la concentración de nutrientes suele inhibir el desarrollo de la Fusariosis vascular del tomate, sin embargo, las sales de cloro favorecen el desarrollo de la Fusariosis en apio (Jones et al., 1989). Por otra parte, suelos salinos o suelos cuya salinidad ha sido inducida incrementan la incidencia y la severidad de las Verticilosis vasculares de patata, tomate, alfalfa y olivo (Pegg y Brady, 2002; Levin et al., 2003, 2007).

El **estado nutritivo** afecta a la incidencia de las enfermedades. En los composts, la proporción de lignina/celulosa de los residuos influye en la duración del proceso de compostaje y en el posterior manejo de la fertilización de éstos como sustratos (Hoitink y Fahy, 1986). Las cortezas de pino, por ejemplo, o no son compostados o reciben cortos períodos de compostaje, debido la alta relación lignina/celulosa. Debido a ello, no inmovilizan cantidades significativas de nitrógeno (Brown y Pokorny, 1975; Cobb y Kever, 1984). Al contrario, composts con niveles significativos de descomposición, como los lodos de depuradora o las cortezas de frondosas, no necesitan enmienda extra de nutrientes esenciales. Por el contrario, ambos presentan diferencias en sus efectos sobre la nutrición del nitrógeno, mostrando ratios carbono/nitrógeno bajas y altas, respectivamente.

La **nutrición del nitrógeno** afecta a la gravedad de un gran número de enfermedades de origen en el suelo (Huber y Watson, 1974), incluyendo entre éstas las inducidas por *Phytophthora* spp. y las formas especiales de *F. oxysporum* (Schmitthenner y Canady, 1983; Jones et al., 1989). Composts con una alta tasa de nitrógeno favorece las Fusariosis vasculares, teniendo la forma de nitrógeno disponible

en el sustrato un efecto relevante. El nitrógeno amoniacal favorece la incidencia de la Fusariosis vascular, mientras que el nitrógeno en forma de nitrato tiene el efecto opuesto (Schneider, 1985, Hoitink et al., 2001). Respecto a la Verticilosis, hay una importante ausencia de información sobre su influencia en este patosistema, mostrando, incluso, situaciones contradictorias. Mientras que genéricamente el uso de bajas entradas de N están asociadas a una menor incidencia y severidad de la enfermedad (Pegg y Brady, 2002), como por ejemplo en la Verticilosis del olivo (El-Zik, 1985), otros estudios señalan que los resultados dependen de la dosis o sobre la forma del N químico aplicado (Pegg y Brady, 2002).

La **tasa de consumo de oxígeno** de un composts esta condicionado por la madurez de un compost, e influye en procesos del desarrollo vegetal y de las comunidades microbianas residentes en el compost. Bajas presiones parciales de oxígeno por el mantenimiento de altas tasas de descomposición en un compost poco estabilizado (Hoitink y Fahy, 1986; Hoitink et al., 1991), pueden suponer un estrés para la planta, lo que puede predisponerla a ciertas enfermedades o incrementar el potencial de inóculo del fitopatógeno, dado que los estreses incrementan la exudación de semillas y raíces (Lockwood, 1988). La tasa de respiración (OUR) depende del patosistema en estudio. Así, la OUR ha sido negativamente correlacionada con la enfermedad en el patosistema *V. dahliae*/berenjena y positivamente en el patosistema *R. solani*/coliflor (Termorshuizen et al., 2006). Por otra parte, la adición de aguas residuales de la industria del olivo aumentó la respiración del suelo como resultado de un cambio en la comunidad microbiana, lo que indujo supresividad contra *R. solani* en lechuga (Kotsou et al., 2004).

Es conocido que algunos compost liberan **sustancias inhibidoras** a la fase acuosa del sustrato, que dificultan o inhiben el crecimiento y/o desarrollo de ciertos hongos fitopatógenos (Hoitink, 1980; Hoitink y Fahy, 1986). Estas sustancias pueden participar en la supresividad de estos sustratos frente a determinadas enfermedades, al reducir el potencial de inóculo de estos patógenos, proporcionando un ambiente abiótico desfavorable para los mismos (Aviles y Tello, 2001). La capacidad supresiva de residuos compostados de la industria del olivo esta asociada con la presencia de compuestos fenólicos característicos de este tipo de materiales (Al-Mughrabi et al., 2001; Lima et al., 2008). También hay que tener en cuenta que en la composta se

desarrollan importantes producciones de microorganismos, algunos de los cuales son productores de **antibióticos**, productos que también podían participar en los efectos fungitóxicos del sustrato (Avilés y Tello, 2001).

### **10.3. Factores biológicos.**

La supresividad natural de un compost viene dada tanto por sus propiedades físico-químicas como por las comunidades microbianas residentes en él, las cuales pueden ejercer mecanismos de actuación en función de determinados patógenos vegetales, de forma singular o en asociación con otras comunidades, denominándose Agentes de Control Biológico (ACBs). Numerosos estudios indican que la causa de la mayoría de los fenómenos de supresividad, asociados a los sustratos a base de compost, se debe a los denominados factores biológicos (Hoitink y Fahy, 1986; Avilés y Tello, 2001).

#### *10.3.1. Los Agentes de Control Biológico.*

Los ACBs son microorganismos que pueden consistir en cepas hipovirulentas del patógeno que compitan físicamente con las cepas silvestres, o en otros organismos o productos derivados de los mismos que antagonicen al patógeno o a sus mecanismos para provocar la enfermedad (Rincón et al, 2008). Pero el efecto beneficioso que un ACB puede desplegar contra un determinado fitopatógeno requiere de complejas y delicadas interacciones entre el patógeno, la planta hospedadora, el medioambiente y el mismo ACB (Fravel 1988; Weller 1988; Thomashow y Sèller, 1996), requiriendo entre otras cosas una previa y satisfactoria colonización del nicho diana por parte del agente (rizosfera, tejidos internos de la raíz, ...).

Existen diferentes especies de microorganismos que se han identificado como ACBs frente a diversos tipos de enfermedades de origen edáfico (Kwok et al., 1987; Leben et al., 1987; Weller, 1988; Couteaudier y Tello, 1990; Berg et al., 1994; Ardí y Sivasithamparam, 1995; Hjeljord y Tronsmo, 1998; Larkin y Fravel, 1998, 2002; Nagtzaam et al., 1998; Thomashow y Weller, 1996; Madi et al., 1997; Alström, 2001; Doumbou et al., 2002; Narisawa et al., 2002; Weller et al., 2002; Xia et al., 2002; Benítez et al., 2004; Coombs et al., 2004; Harman et al., 2004; Mercado-Blanco et al.,

2004; Tjamos et al., 2004, 2005; El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006; Forsyth et al., 2006; Trillas et al., 2006; Anand et al., 2008; Antonopoulos et al., 2008; Dutta et al., 2008; Quencine et al., 2008; Vinale et al., 2008; Abo-Elyousr et al., 2009; Erdogan y Benlioglu, 2010; Meschke y Schrempf, 2010; Sant et al., 2010; Zheng et al., 2011).

El control biológico, mediante el uso de microorganismos, ofrece un enfoque alternativo y atractivo para el control de las enfermedades vegetales de origen edáfico, sin el impacto negativo de los químicos. Esto se ha convertido en un principio importante para la agricultura sostenible ya que algunos pueden incluso activar los mecanismos de resistencia sistémica/resistencia inducida de la planta y, por lo tanto, mejorar indirectamente los rendimientos y el crecimiento de las mismas (Dukare et al., 2011). Además de ser una técnica sostenible y medioambientalmente aceptada, puede ser usada en combinación con otras herramientas de control dentro del marco de una estrategia integrada de manejo de la enfermedad (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

#### 10.3.2. *Mecanismos de acción de los Agentes de Control Biológicos.*

Los ACB pueden funcionar a través de varios modos de acción (Rincón et al., 2008):

- Como **agentes antagonistas** del patógeno, mediante la inactivación de los sistemas de ataque del patógeno, anulando su modo de acción, por antibiosis, es decir, por la secreción de metabolitos secundarios difusibles y de bajo peso molecular con efecto antibiótico (Brisbane y Rovira, 1988); por modificación de la rizosfera, por ejemplo con la variación del pH, haciendo que se dificulte la colonización de la misma por parte de los patógenos (Benítez et al., 2004); por hiperparasitismo/micoparasitismo produciéndose un ataque directo al otro hongo (Harman et al., 2004), y por competencia, ligada a la antibiosis y al micoparasitismo.

- Mediante **aislados avirulentos o hipovirulentos**, por competencia por el espacio y por los nutrientes; debido a su versatilidad metabólica, las especies antagonistas colonizan un medio más rápidamente que el patógeno, evitando así la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat (Hjeljord y Tronsmo, 1998; Benítez et al.

2004); por exclusión pasiva del lugar de penetración del patógeno (Harman et al., 2004) y por inducción de los sistemas de defensa de la planta.

- Mediante **inducción el sistema de defensa** vegetal. Las plantas carecen de un sistema inmunitario propiamente dicho como el que presentan los animales. En cambio, son capaces de responder a las heridas y a la presencia e invasión de patógenos presentes en el ambiente. Nos encontramos dos tipos de resistencia sistémica:

- La **SAR** (systemic acquired resistance) se caracteriza porque en el sitio de necrosis e invasión patogénica se activa la producción y acumulación local del ácido salicílico (SA), además de una señal móvil por el floema. En zonas distantes, las concentraciones de SA aumentan y el metil-SA volátil se libera. Todas estas señales inducen la síntesis de proteínas PR (pathogenesis-related) en zonas donde el patógeno no está presente (Vasyukova y Ozeretskovskaya, 2007).

- La **ISR** (induced systemic resistance), muy relacionada con la respuesta a heridas, suele estar causada por rizobacteria no patogénica que coloniza las raíces vegetales. Microorganismos no patógenos presentes en la rizosfera interaccionan con la planta pero carecen del programa génico específico para iniciar el proceso de infección (Harman et al. 2004; Segarra et al. 2007; Anand et al, 2008; Dutta et al., 2008). Requiere la señalización de las hormonas ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) para la inducción de la respuesta defensiva en tejidos distantes de la planta. En esta forma de defensa no se requiere SA ni se producen proteínas PR. Esta inducción de la resistencia sistémica en la planta conduce a un pre-acondicionamiento, iniciándose la síntesis de fitoalexinas cuyo papel es clave en la resistencia vegetal a la invasión de un agente fitopatogénico compatible.

Pero, aunque todos y cada uno de estos modos de acción estén bien caracterizados, en el proceso de biocontrol suele ocurrir que el fenómeno esté acompañado por más de un mecanismo de acción (Vinale et al., 2008).



### 10.3.3. Tipos de Agentes de Control Biológico frente a las Fusariosis y Verticilosis vasculares.

Aunque actualmente existen estudios sobre el control biológico de las Verticilosis vasculares, estas se han centrado principalmente en hospedadores herbáceos y en sólo una pequeña parte de especies de hongos del suelo (*Trichoderma*, *Talaromyces*) o bacterias (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*), cuya implicación como potenciales ACBs contra *V. dahliae* ha sido ampliamente demostrada (Jordan y Tarr, 1978; Leben et al., 1987; Berg et al., 1994; Madi et al., 1997; Alström, 2001; Nagtzaam et al., 1998; Narisawa et al., 2002; Tjamos et al., 2004, 2005; Antonopoulos et al., 2008; Uppal et al., 2008; Erdogan y Beliloglu, 2010; Meschke y Schrempf, 2010). Además, para proteger de eventuales infecciones de *V. dahliae* tras el trasplante, se está planteando el uso de alternativas de control combinadas, como la certificación libre de patógenos durante el proceso de propagación de plantas de olivo y la aplicación de microorganismos antagonistas a la Verticilosis (Tjamos 1993; Mercado-Blanco et al, 2004).

Preferentemente, y siguiendo la línea de trabajo presentada en esta Tesis, esta revisión se centrará principalmente en dos géneros ampliamente caracterizados como potenciales ABCs, *Fusarium* spp. y *Streptomyces* spp., y en su control sobre las Fusariosis vasculares.

Los estudios realizados sobre los mecanismos de resistencias de algunos suelos a la fusariosis vascular han permitido formular hipótesis de una competencia entre aislados de *Fusarium* patógenos y no patógenos, que se desarrollan en el suelo y en la rizosfera de las plantas cultivadas (Couteaudier y Tello, 1990; Larkin y Fravel, 1998, 2002; Fravel et al., 2003; Alabouvette et al., 2006; Forsyth et al, 2006; Olivain et al., 2006).

Actualmente existen numerosos estudios sobre *Fusarium* spp. no patogénicos y su implicación como ACBs. Una intensa colonización sobre la superficie radicular de plantas de tomate por estirpes no patogénicas de *Fusarium oxysporum* competían con una estirpe de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En función de la concentración de ambos organismos, el crecimiento del patógeno pudo ser restringido, pero no suprimido

(Olivain et al., 2006). De forma competitiva, aislados no patogénicos de *F. solani* pueden funcionar como ACBs frente a la Fusariosis vascular del tomate, pudiendo ser más efectivos que otros agentes de control microbiológico (Larkin y Fravel, 1998).

Sin embargo, antes de poner en práctica estos ACB, es esencial determinar como le pueden afectar diversas condiciones ambientales (Alabouvette et al., 2006). En ensayos con cultivo de tomate, *Fusarium solani* ha demostrado su eficacia para controlar la marchitez provocada por *Fusarium oxysporum* en diferentes regímenes de temperatura, en suelos con distintas texturas y con diferentes contenidos en materia orgánica. También ha reducido la enfermedad en distintos cultivares de tomate (Larkin y Fravel, 1998).

Aún observando un posible papel protagonista de aislados no patogénicos de *Fusarium* en la contención de la severidad de la enfermedad, existen aislados no patogénicos de *Fusarium* spp. que pueden, incluso, llegar a incrementarla (Forsyth et al., 2006).

Pero aparte de determinados aislados de *Fusarium* spp., hay una gran diversidad de taxones y grupos ecológicos relacionados con el control biológico. Por ejemplo, se han observado poblaciones de actinomicetos oligotrofos y celulolíticos y de *Bacillus* spp. (Borrero et al., 2004, 2005) que reducen la Fusariosis vascular del tomate.

Los actinomicetes se han usado extensivamente en la industria farmacéutica y en la agricultura a causa de su gran diversidad en la producción de enzimas (Quecine et al., 2008) con características bactericidas, fungicidas, acaricidas, herbicidas e insecticidas (Doubou et al., 2002; Kim y Hwang, 2007). Actinomicetes endofíticos se han citado como prometedores ACBs, bien actuando directamente sobre las paredes vegetales del hongo o bien incrementando la respuesta defensiva vegetal (Gupta et al., 1995; Coombs et al., 2004; Kim y Hwang, 2007). Actualmente existen productos de biocontrol basados en productos sintetizados por actinomicetos (Doubou et al., 2002).

La mayoría de los trabajos desarrollados sobre el biocontrol de cepas de actinomicetos han sido realizados sobre miembros del género *Streptomyces* (Koch y Löffler, 2008; Quecine et al., 2008), aunque también se han documentado actinomicetos

no-streptomicetes como potenciales agentes de control biológico (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006).

#### 10.3.4. *Caracterización y calidad de la Materia Orgánica de los sustratos respecto a la actividad de los microorganismos presentes en los composts.*

El nivel de descomposición de la materia orgánica del sustrato es quien determina su capacidad de sostenimiento microbiano y su extensión en el tiempo (Chen et al., 1988a; Mandelbaum y Hadar, 1990; Craft y Nelson, 1996; Hoitink et al., 1996). Es la lenta liberación natural de los nutrientes orgánicos (principalmente carbohidratos poliméricos), inmovilizados en los composts maduros, la que soporta la actividad de la microflora y así mantiene el biocontrol, dando lugar a la denominada *supresión general*, anteriormente descrita.

Recientes avances en la comprensión de la naturaleza y complejidad de las poblaciones microbianas, la química de los sustratos y las interacciones entre estos dos componentes han contribuido a una mayor comprensión de estos sistemas dinámicos (Chen e Imbar, 1993; Hoitink et al., 1993b; Hoitink et al., 1996; Hoitink y Boehm, 1999; Boehm et al., 1997; Termorshuizen et al., 2006; Borrero et al., 2006; Janvier et al., 2007; Bonanomi et al., 2010).

Los métodos de RMN en estado-sólido se han convertido en técnicas extremadamente poderosas para el estudio de la estructura y la biogeoquímica de la materia orgánica (Boehm et al., 1997; Bonanomi et al., 2010). Entre sus ventajas destacan la consideración de técnica no destructiva y el uso de pequeñas cantidades de material para el análisis de las muestras. El principal problema de la técnica deriva en el tipo de material en estudio. Muestras sólidas complejas tienen tiempos de adquisición de datos que pueden llegar a alcanzar las 24 h por muestra. Pero los avances en el estudio de la tecnología RMN están generando espectrómetros de mayor campo (>300 Mhz), pudiendo reducir considerablemente el tiempo de adquisición de los datos de muestras complejas.

El análisis de la Materia Orgánica de los suelos mediante Solid-State  $^{13}\text{C}$  NMR proporciona información respecto a las cantidades relativas de carbonos alifáticos,

aromáticos, fenólicos, carboxílicos y carbonilos, sustituidos o no sustituidos ([Simpson y Preston, 2007](#)). El grado de descomposición de la materia orgánica críticamente afecta la composición de los taxones bacterianos así como las poblaciones y actividades de los distintos agentes de biocontrol ([Hoitink y Boehm, 1999](#)). Debido a ello, el conocimiento de la composición de la materia orgánica de los sustratos supresivos es clave en el estudio de la supresión de las enfermedades vegetales.

# **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS GENERALES

1.- *Estudio de la diversidad genética y de la prevalencia racial de una población de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (FOD) obtenida en una región con una alta tradición en el cultivo del clavel (costa noroeste de Cádiz), además de conocer su distribución racial.*

El objetivo de este estudio es caracterizar la población patogénica (conocer su diversidad genética y racial) de FOD en un área con una alta tradición en el cultivo de clavel, debido a que tales conocimientos proporcionarían información con una alta trascendencia práctica, para el futuro desarrollo de programas de mejora para la obtención de cultivares resistentes.

2.- *Estudio de la supresividad asociada al empleo de composts (compost de orujo de vid y compost de corcho) como sustrato hortícola frente a las Fusariosis vasculares del clavel y del tomate.*

El objetivo de este estudio es determinar que parámetros físicos, químicos y biológicos están vinculados con la supresividad en estos patosistemas. Con especial interés en la composición de la materia orgánica mediante Resonancia Magnética usando SP MAS  $^{13}\text{C}$  NMR y en su relación con el mantenimiento de una comunidad microbiana relacionada con el efecto supresivo de estos sustratos a base de composts.

3.- *Estudio de la combinación de sustratos supresivos (compost de orujo de vid y compost de corcho) y la introducción de agentes de control biológico (ACBs) frente a la Fusariosis vascular del tomate. .*

El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia en el control de la Fusariosis vascular del tomate, en condiciones de invernadero, de la combinación de dos agentes de control biológico (un *Fusarium* sp. y un *Streptomyces* sp.) pre-seleccionados de compost de sustratos hortícolas que difieren en su comportamiento supresivo a esta enfermedad.

*4.- Estudio de la supresividad de sustratos hortícolas formulados con composts (compost de orujo de vid, compost de corcho y compost de alperujo) frente a la Verticilosis del algodón y del olivo.*

El objetivo de este estudio es determinar qué parámetros físicos, químicos y biológicos afectan al comportamiento supresivo del sustrato.



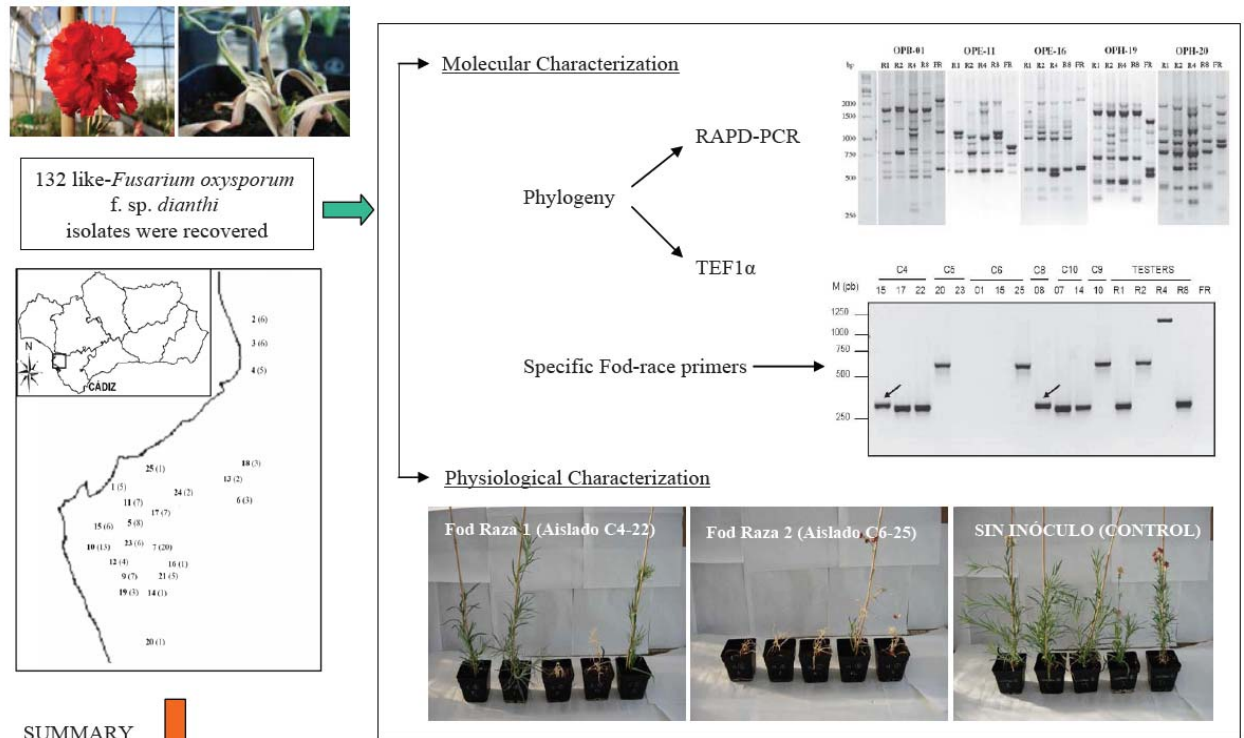
# **CAPÍTULOS**



# CAPÍTULO 1

## *Caracterización biológica y molecular de Fusarium oxysporum f. sp. dianthi en el sur de España.*

### Abstract Gráfico



**SUMMARY**

Races	Specific primers				Groups	TEF1 $\alpha$			
	Frequency		Prevalence <sup>a</sup>			Frequency		Prevalence	
	Ib	Ib/Ti	F	F/AF		Ip	Ip/Ti	F	F/AF
Race 1-8	42	31.8%	21	38.9%	III	41	31.1%	20	37.0%
Race 2	71	53.8%	31	57.4%	I	74	56.1%	32	59.3%
Retarded band	13	9.8%			V (Fp)	10	7.6%	6	11.1%

**CONCLUSIONS**

Most prevalence: Fod race 2  
 High homogeneity intra-races  
 Interference with specific primers  
 Presence of *Fusarium proliferatum* in the population  
 A Fod race 2 subgroup could be present in this zone



## CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* EN EL SUR DE ESPAÑA.

### Resumen

---

Estudiamos la diversidad de razas y la prevalencia de las poblaciones patógenas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) en un área en el noroeste de la provincia de Cádiz (España). A partir de 54 invernaderos, se recolectaron 132 aislados de plantas de clavel con síntomas de marchitez. Las técnicas moleculares, como estudios filogenéticos [utilizando RAPD-PCR fingerprinting y secuenciación del Factor de Elongación de la Transcripción (TEF1- $\alpha$ )] y el análisis con rmarcadores moleculares específicos de raza, se utilizaron para caracterizar estos aislados.

Aislados seleccionados de grupos RAPD fueron evaluados fenotípicamente mediante pruebas de patogenicidad. Todos estos datos mostraron que la raza 2 de Fod fue la raza más frecuente y prevalente en el área de estudio, seguido por la raza 1 u 8. Además, los análisis filogenéticos mostraron resultados similares, que diferían a los de los ensayos usando marcadores moleculares específicos de raza.

Tres hallazgos fueron lo más destacado de estos resultados: i) siete de los aislados no fueron agrupados en los grupos donde los testers de Fod fueron clasificados, incluso mostraron resultados diferentes cuando se utilizaron los marcadores específicos de raza, ii) diez aislados con banda específica de raza 1 u 8 se caracterizaron como *F. proliferatum* mediante secuenciación del gen *TEF1- $\alpha$* , agrupándose fuera del dendograma, y iii) seis aislados no generaron señal de amplificación utilizando marcadores específicos de raza. Por otra parte, tres de ellos se agruparon junto al tester de Fod raza 2 según análisis filogenéticos, demostrando incluso la misma patogenicidad diferencial que el tester raza 2. Esto podría indicar la presencia de un subgrupo de raza de Fod 2 en esta región.



**Biological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in  
Southern Spain**

Authors:

Castaño, R.<sup>1</sup>, Scherm, B.<sup>2</sup>, Avilés, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Ciencias Agroforestales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica (ETSIA), University of Seville. Ctra. Utrera km. 1, E-41013 Seville, Spain;

<sup>2</sup> Dipartimento di Protezione delle Piante, Università degli studi di Sassari, Via Enrico de Nicola 9, I-07100 Sassari, Italy.





## ABSTRACT

We surveyed the diversity of races and prevalence of pathogenic populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) in an area in the northwest of the province of Cadiz (Spain). From 54 farms, 132 isolates were collected from wilted carnation plants. Molecular techniques, namely phylogenetic studies [using RAPD-PCR fingerprinting and sequencing of the transcription elongation factor (*TEF1- $\alpha$* )] and analysis with race-specific molecular markers were used to characterize these isolates. Selected isolates from RAPD groups were phenotypically evaluated by pathogenicity tests. All these data showed that Fod race 2 was the most frequent and prevalent race in the study area, followed by race 1 or 8. Moreover, phylogenetic analyses showed similar results, which were different to those of the race-specific PCR assays. Three findings were highlights from these results: i) seven isolates were not classified in groups where Fod testers were clustered, even they showed different results when race-specific markers were used, ii) ten isolates with retarded race 1 or 8 specific-band were characterized as *F. proliferatum* by *TEF1- $\alpha$*  gene sequencing and clustered into an outgroup, and iii) six isolates failed to generate an amplification signal using race-specific markers. Furthermore, three of them were grouped close to the race 2 tester according to the phylogenetic analyses, and showed the same differential pathogenicity as race 2. This may indicate the presence of a Fod race 2 subgroup in this region.

## INTRODUCTION

*Fusarium oxysporum* Schlechtend. emend. W. C. Snyder & H. N. Hans. is a species complex of morphologically similar fungi with multiple phylogenetic origins that fall into three well-supported clades (9). Pathogenic isolates of *F. oxysporum* often display a high degree of host specificity and can be subdivided into *formae speciales* on the basis of the plant species affected. The *forma specialis dianthi* (Fod) causes Fusarium wilt of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), a disease that is responsible for severe losses in areas where this flower is grown. The pathogen is widespread in soils worldwide (1,6,18,32).

In 2009, Andalusia accounted for 55.4% of the total carnations produced in Spain, and 62.1% of this was from the province of Cadiz (4), which is the greatest producer in Europe (29). In this area, Fusarium wilt disease appeared five years after the introduction of the first carnation plants in 1975. Since then, it has been reported continuously (19). Despite this, exhaustive studies on race diversity and pattern of Fod distribution in this area are lacking (32).

Fod can be distinguished into physiological races on the basis of the capacity of the pathogen to attack differential carnation cultivars. To date, ten races have been described worldwide (32). Races 1 and 8 apparently originated in the Italian Riviera, where they are associated with Mediterranean carnation ecotypes found in Italy, France and Spain. Race 2 is widespread in all areas of carnation cultivation in the world. Race 4 is found in carnation cultivars in the United States, Italy, Israel, Spain and Colombia. Race 3 was initially classified as a Fod race, but DNA-based methods recently reclassified it as *F. redolens*, revealing that *F. redolens* and *F. oxysporum* are not only

different species but also lack a sister group relationship (9). The other races described have not been found in carnation crops in the Spanish areas studied so far (3).

Race classification of Fod can be established by testing its virulence using differential carnation cultivars (18,32) or PCR with specific molecular markers to determine Fod races 2, 4 and, jointly, 1 and 8 (13). Regarding race specific primers, they were designed on the basis of transposable elements *Fot1* and *impala*, whose restriction profiles show a race-associated polymorphic pattern using Southern hybridization (13). Fingerprinting techniques (such as random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR) have been applied to evaluate the level of genetic diversity in various *F. oxysporum formae speciales*, including *dianthi* (6,18,27). This technique can also separate Fod races (18,27). Moreover, previous studies to establish a reliable molecular marker for phylogenetic studies on different *Fusarium* species have been conducted. The *TEF1- $\alpha$*  gene is considered highly informative for differentiating *Fusarium* spp. and many *formae speciales* within the *F. oxysporum* species complex (16,18,21,31). These phylogenetic techniques could provide further information and reinforce the separation of Fod races using specific markers.

The determination of race and genetic diversity in pathogen populations in a given region provides relevant information of practical significance (33), which is useful for developing resistance breeding programs aimed at selecting cultivars that can reduce the devastating effects of *Fusarium* wilt in a given area (2,20). The aim of this study was to survey the racial diversity and prevalence of a Fod population in the North-West of the Cadiz province, a region with a long tradition of carnation cultivation, using phenotypic and molecular assays.

## MATERIALS AND METHODS

**Sampling process.** Wilted carnation plants were sampled from 54 randomly selected farms in three municipal areas of Andalucía, Spain (Chipiona, Sanlúcar de Barrameda, and Rota) from 2004 to 2006. One isolate was obtained from each disease focus in different greenhouses per farm. The sampling locations are shown in Table 1 and Figure 1.

**Pathogen isolation.** Plants were cut at the stem base and the obtained pieces were surface-sterilized using 10% (v/v) sodium hypochlorite for 2 min. After two wash steps in sterile distilled water (SDW), the stem fragments were air-dried and transferred to Komada's *Fusarium* semi-selective medium (15). Plates were incubated at 25°C and fungi were monitored daily. Later, fungi were transferred to potato dextrose agar (PDA, Merck) plates. A total of 132 isolates displaying *Fusarium* morphology were recovered. Two monosporic cultures from each isolate were stored in silica gel at 5 to 10°C (34).

**Total DNA isolation.** Fungi stored on silica gel were grown on sterile cellophane disk plates on PDA and incubated at 25°C for 7 to 8 days. Mycelium was recovered and transferred to a sterile Eppendorf tube. Tubes were frozen and then lyophilized (Telstar Cryodos, Telstar, UK) for 24 h. Total genomic DNA was extracted from the lyophilized isolates as described by Cassago et al. (10), with minor modifications. Approximately 0.2 g of lyophilized mycelium was used. DNA was re-suspended in 40 µl of TE-RNase (10 µg/ml) at 37°C for 30 min. Concentration and purity of total DNA was determined by spectrophotometric measurements at 260 nm and 280 nm.

**RAPD-PCR analysis.** Population profiles were created by RAPD-PCR fingerprinting. Five 10-mer oligonucleotides were chosen on the basis of (i) previous genetic diversity studies with Fod and other *F. oxysporum* pathogens (OPB-01 (11,36), OPE-11 and OPE-16 (18)), and (ii) polymorphic band patterns (OPH-19 and OPH-20 (Operon Technologies, Alameda, CA, USA)).

The amplifications were performed in a total volume of 20  $\mu\text{l}$  containing 7.5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  of genomic DNA, 1x Biotools standard reaction buffer, 2.5 mM of  $\text{MgCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  of dNTP (Biotools, Madrid, Spain), 1  $\mu\text{M}$  of each primer, and 1 U of Biotools DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain). The amplification conditions were as follows: a denaturation step for 5 min at 94°C, followed by 45 amplification cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 36°C and 2 min at 72°C. A final extension step was performed for 5 min at 72°C. Reactions were performed with a thermal cycler (Gene Amp® PCR System 2700, Applied Biosystems). Amplified DNA products were run on 1.5% agarose gels, separated by electrophoresis, and DNA was visualized and photographed under UV light with a Transilluminator (BioDoc-it™ System, UVP).

Each band in the RAPD profiles was considered an independent locus with two alleles and transformed into binary codes on the basis of presence versus absence of amplification products (1 for presence and 0 for absence). The amplification products of different primers recorded on photos were scored manually and a binary matrix was thus generated (38). Forty-one markers were analyzed using five operon primers. From the binary data matrix, we estimated the distances using the distance estimation method described by Link et al. (30), using TREECON (35) of the Windows software package. Tree topology was inferred with the UPGMA (unweighted paired group method with arithmetic averages) clustering method to construct an unrooted tree (38). Amplifications were repeated one time with each monosporic culture from each isolate

**Isolate determination by DNA sequencing.** A portion of the translation elongation factor 1- $\alpha$  gene (*TEF1- $\alpha$* ) was amplified using EF1 and EF2 primers. Each 50  $\mu$ l of PCR reaction contained 7.5 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup> of genomic DNA, 1x Biotools standard reaction buffer, 3.75 mM of MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M of dNTP (Biotools, Madrid, Spain), 0.5  $\mu$ M of each primer and 1 U of Biotools Pfu DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain). The PCR for both primer pairs was run at 95°C for 2 min, followed by 10 cycles of 94°C for 1 min, 54°C for 2 min, and an elongation phase at 72°C for 2 min, and 20 cycles of 94°C for 1 min, 54°C for 2 min, and an elongation phase at 72°C for 2 min with an increase of 4 s per cycle, concluded by a final elongation phase at 72°C for 5 min. Reactions were performed with a thermal cycler (Gene Amp® PCR System 2700, Applied Biosystems). Amplified DNA products were run on 1.5% agarose gels and DNA photographed under UV light, as described previously. The expected amplification product size was 700 bp. PCR products were purified using Speedtools PCR Clean-up Kit (Biotools, Madrid, Spain). Sequencing was performed by Secugen (Secugen, Madrid, Spain).

Sequences were edited and then blasted against the GenBank database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). To match the *TEF1- $\alpha$*  gene in conjunction with GenBank, we used the *Fusarium*-ID database (<http://fusarium.cbio.psu.edu>). This database is publicly available and contains vouchered and well-characterized sequences of *Gibberella fujikuroi*, *F. oxysporum* and *F. solani* species (21). Accession numbers of *TEF1- $\alpha$*  regions from selected isolates are shown in **Table 3**.

**Phylogenetic distance tree using TEF1- $\alpha$  gene sequences.** Sequences were edited using Sequence Scanner v1.0 software (Applied Biosystems) and aligned to construct a phylogenetic tree using the MEGA5 software (23). Evolutionary history was inferred

from the maximum likelihood method based on the Kimura 2-parameter model (22). The tree with the highest log likelihood (-1413.6427) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search (Close-Neighbor-Interchange algorithm) were obtained automatically as follows. When the number of common sites was < 100 or less than one fourth of the total number of sites, the maximum parsimony method was used; otherwise the BIONJ method with a Maximum Composite Likelihood (MCL) distance matrix was used. The tree was drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 137 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 640 positions in the final dataset.

**Bacterial, *F. redolens* and Fod race-specific PCR assays.** Bacterial 16S rDNA was used to control for the presence and accessibility of eubacterial DNA, which could amplify false RAPD markers. For this purpose, we used 704f and 1495r primers (8). Specific *Fusarium redolens* (Fr) primers, Redolens-F and Redolens-R (9), were used to detect the presence of this pathogen in the population. Fod races were determined using race-specific primers (Ft3f, IMP2f, R8.1r, R2.1r and R4.2r) designed by Chiochetti et al. (13). Primers were provided by cVIRAL (Alcobendas, Madrid, Spain). Negative and positive controls were included in all experiments. The bacterial isolate 911 (Collection of Dr. M. Aviles, University of Sevilla, Spain), *F. redolens* (provided by Dr. E.T. Steenkamp, University of Pretoria, Pretoria, South Africa) and the Fod race testers (provide by Dr. J.M. Melero, CSIC, Córdoba, Spain) were used as positive controls for each PCR assay.

We used a 20- $\mu$ l reaction volume containing 7.5 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup> of genomic DNA, 1x Biotools standard reaction buffer, 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M of dNTP (Biotools, Madrid, Spain) and 1 U of Biotools DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain). Primers were added as follows: 0.5  $\mu$ M each for eubacterial DNA detection (8), 0.5  $\mu$ M each for Fr detection (9) and 2.5  $\mu$ M each for race determination (13). Reactions were performed with a thermal cycler (Gene Amp® PCR System 2700, Applied Biosystems) following the respective authors' protocols. After amplification, the reaction mixture was loaded onto a 1.5% agarose gel and photographed under UV light as described previously. The expected amplification product sizes were 800 bp for eubacteria, 386 bp for Fr, and 295, 564 and 1315 bp for Fod races 1/8, race 2 and race 4, respectively. Analyses were repeated one time with each monosporic culture from each isolate.

**Southern blotting.** The *Fot1* probe from *F. oxysporum* f. sp. *melonis* was amplified with the P.LTR primer (17) under the following conditions: 50  $\mu$ l of the PCR reaction contained 7.5 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup> of genomic DNA, 1x reaction buffer with MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M of dNTP, 0.5  $\mu$ M of primer and 2 U of Top Taq DNA polymerase. The PCR run was carried out at 95°C for 4 min, followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, (10 cycles of 65°C to 61°C each 2 cycles for 1 min, 20 cycles to 60°C) and an elongation step at 72°C for 1.5 min, ending with a final elongation step at 72°C for 7 min. Genomic DNA (10  $\mu$ g) was digested with 80 units of *Xho*I at 37°C for 16 h and resolved in a 1% agarose gel. Digested DNA was blotted onto Nylon N membranes (Amersham, Little Chalfont, England) by alkaline vacuum transfer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), following the manufacturer's instructions. The probe was labeled with a randomly primed digoxigenin (DIG)-labeling system (Boehringer) and filters were hybridized at 50°C for 16 h. Chemiluminescent detection by the non-radioactive DIG DNA detection kit



(Boehringer Mannheim, Germany) was performed following the manufacturer's instructions.

**Fusarium wilt pathogenicity test.** Determination of race is based on the response of the different cultivars to a particular isolate. For this phenotypic assay, at least one isolate of each RAPD group was selected on the basis of the similarity index after the fingerprinting study (3,33,36). Pathogenicity test was performed with five different carnation (*D. caryophyllus*) cultivars ('Reina', 'New Elsy', 'Mayor', 'Suprema' and 'Eilat'); summarized response in **Table 2**) in a greenhouse in Seville (Seville, Spain) from June to August 2009. Plants were provided by Barberet & Blanc (Murcia, Spain) as bare-root cuttings (8 to 12 true-leaf stage). Fungi were grown for 7 to 10 days on AMAP (10 g L<sup>-1</sup> agar, 10 g L<sup>-1</sup> malt extract (Difco, Le Pont de Claix, France) and 2 g L<sup>-1</sup> asparagine (Difco, Le Pont de Claix, France) plates at 25°C. Five ml of SDW were added to the plates and the surface was scraped with a sterile spatula. Inocula were filtered through two layers of sterile gauze. The concentration of conidia was determined with a hemocytometer and then diluted in SDW to give suspensions of 10<sup>6</sup> conidia ml<sup>-1</sup>. These suspensions were used to inoculate carnation cuttings by root dipping for 30 min using 50 to 80 ml per plant. Controls were carried out by dipping plant roots in sterile water. Inoculated cuttings were individually planted in pots containing peat fertilized with 0.5 g L<sup>-1</sup> of Peter's Foliar Feed (27+15+12; N+P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+K<sub>2</sub>O; and micronutrients; Scotts, Heerlen, the Netherlands) and 0.5 g L<sup>-1</sup> of Fertegreen. The experimental design involved five plants for each isolate and cultivar combination, randomized within each cultivar.

Disease severity was scored using the symptom severity scale described by Baayen and Van der Plas (5) as follows: 0 = asymptomatic plant (0% disease); 1 =

weakly affected plant (5%); 2 = local base-stem symptoms (20%); 3 = unilateral and well-developed symptoms (50%); 4 = strong disease symptoms throughout the plant (80%); 5 = dead plant (100%). Disease severity was monitored twice a week. At each assessment, the mean disease severity per pot was calculated. The standardized area under the disease progress curve (AUDPC) was calculated by disease severity integrated between symptom onset and the final time of the assay and divided by the total duration (days) of the epidemic in each bioassay. Therefore, AUDPC data can range from 0 to 1. High severity was considered when AUDPC was higher than 0.45. Moderate severity when AUDPC data range between 0.45-0.30 and low severity was considered when AUDPC data range between 0.30-0.20. Pathogenicity test was repeated twice. Each test lasted three months.

**Statistical analysis.** Data collected from the pathogenicity bioassay were analyzed with the Statgraphics Plus program (version 5.1; Statistical Graphics Corp., Rockville, MD). Data were analyzed using one-way ANOVA. The means were compared using Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

## RESULTS

**Classification of isolates using RAPD analysis.** All isolates were independently subjected to RAPD-PCR analysis employing five random decamer primers. In the preliminary experiments, all the tested primers produced distinct and reproducible band profiles (**Fig. 2**). Reproducible markers were used in cluster analysis. On the basis of a similarity matrix, we constructed a dendrogram using the UPGMA, thus establishing the level of similarity among isolates (**Fig. 3a**). According to the patterns of all five

primers, isolates were classified into nine RAPD ‘haplogroups’ (RAPD groups), corresponding to an approximately > 90 % similarity index. Each RAPD group showed high genetic homogeneity.

Distance-based analyses of the RAPD groups are shown in **Fig. 3a**. Cluster analysis separated the Fod race testers with an approximately 60% similarity index, showing a bootstrap support of 93%. Seventy-three isolates (plus the Fod race 2 tester) were placed in RAPD group I. An isolate was clustered in RAPD group II, while Fod race 4 was clustered in RAPD group III (**Fig. 3a**). Between RAPD groups III and VII, seven isolates were clustered in three distinct groups (RAPD groups IV, V and VI), whereas one isolate was clustered in RAPD group VII. Forty isolates were clustered in RAPD group VIII, with the Fod race 1 and 8 testers. Finally, ten isolates were outgroupings (**Fig. 3a**) and clustered in RAPD group IX; *F. redolens* was also clustered as an outgroup, closer to RAPD group IX.

**Phylogeny using the *TEF1- $\alpha$*  sequence.** Phylogenetic analysis of the partial *TEF1- $\alpha$*  gene from all isolates (**Fig. 3b**) revealed five groups and *F. redolens* as an outgroup. The Fod race 2 tester was found in TEF group I, along with 74 isolates (the same as RAPD groups I and II). The race 4 tester, as in RAPD analysis, was the only one to cluster in TEF group II. The race 1 and 8 testers and 41 isolates (the same as RAPD groups VII and VIII) were clustered in TEF group III. Isolates clustered in the RAPD groups IV, V and VI (**Fig. 3a**) were in TEF group IV (**Fig. 3b**), while TEF group V comprised the same ten isolates as RAPD group IX. The *TEF1- $\alpha$*  gene region from C4-15 (a representative isolate from RAPD group IX) was subjected to a BlastN enquiry in GenBank, which showed this isolate had high sequence similarity to *F. proliferatum* (a

single mismatch) and had 100% similarity with isolate 165PG/F (Accession n°. GU066714).

Bacterial, *F. redolens* and Fod race-specific PCR assays. Race-correlated amplifications from 95.5% of the isolates were obtained using race-specific primers, as described by Chiochetti et al. (13). Forty-two and 71 of the isolates produced a 295-bp (diagnostic for race 1 or 8) or a 564-bp (specific for race 2) amplification product, respectively. The 1,315-bp amplification product, corresponding to race 4, was never detected in the sampled isolates. Thirteen isolates produced a race 1 or 8 band with retarded electrophoretic mobility, while six isolates did not show any amplification signal/band. All isolates are classified in **Table 1** by race using race-specific primers. Neither *F. redolens* nor eubacteria were detected among the tested isolates. Race characterization and presence of specific amplification bands for *F. redolens* (Fig. 4b), eubacteria (Fig. 4c) and certain isolates (Fig. 4a) are shown in **Figure 4**.

Isolates C6-14, C6-15 and C7-02 (from RAPD group I and TEF group I, where Fod race 2 tester is included) did not show race-specific band. Furthermore, seven isolates were distributed in three RAPD groups (RAPD groups IV, V and VI) and all were clustered in the same TEF group (TEF group IV). RAPD group IV (three isolates) did not produce any race-specific band. RAPD group V (only one isolate) showed a typical race 1- or 8-specific band. RAPD group VI (three isolates) showed an unusual race 1 or 8 specific band with retarded electrophoretic mobility. Similarly, isolates from RAPD group IX (all included in the TEF group V) showed a race 1 or 8 band with retarded electrophoretic mobility (see isolate C4-15). Certain isolates from those RAPD groups are shown in **Figure 4a**.

Isolates C10-07 (RAPD group V), C8-08 (RAPD group VI), C4-15 (RAPD group IX) and the Fod race 8 tester showed an amplification product (race 1 or 8 band with retarded electrophoretic mobility, ~295 bp) only with the race-specific primers Ft3/R8.1. As expected, sequencing of this amplicon (**Fig. 5**) showed that it included the 3' end of the *Fot1* transposon and the *Fot1*-flanking genomic region (Fot1-37, GenBank accession X64799), similar to that observed in the Fod race 8 tester. Moreover, the difference in mobility of the amplified bands from isolates C4-15 and C8-08 could be explained by an additional sequence of 17 nucleotides (CAGGGGGGGTCGGTTAC) located downstream to the 3' inverted terminal repeat of the *Fot1* transposon, which was not observed in the Fod race 8 tester.

**Southern blot analysis.** To determine whether the *Fot-1* transposon was moved or the primer target sequences modified, a Southern blot using a *Fot1*-specific probe was performed with two isolates (C6-14 and C6-15), without specific amplification but clustered near the Fod race 2 tester by both phylogenetic analyses. The restriction pattern confirmed that these two isolates had the same restriction pattern as the Fod race 2 tester, therefore confirming that they indeed belonged to Fod race 2 (data not shown).

**Pathogenicity assay.** Given the high number of isolates, we conducted the pathogenicity test with a subset of the population (**Table 3**) using RAPD analysis as the reference. For this purpose, at least one representative isolate from each RAPD group was selected. Cultivars 'Suprema', 'Reina' and 'Eilat' were susceptible to isolates C5-20, C6-15, C6-25 and C9-10 and the race 2 tester but resistant to others (**Table 4**). But only 'Eilat' showed moderate severity when inoculated with the race 4 tester. Moreover, the cultivar 'Reina' showed lower severity values than cultivars 'Suprema' and 'Eilat'.

The opposite was found with the cultivar ‘New Elsy’, which was susceptible to isolates C4-17, C4-22, C10-14 and to the race 1 tester, but not the race 8 tester. This cultivar could be used to differentiate between races 1 and 8. Cultivar ‘New Elsy’, considered resistant to race 2 in our assay conditions, showed a moderate severity for C6-15 and C6-25 isolates and a low severity for C5-20 and C9-10. The isolate C6-15 was confirmed to belong to race 2, as expected from the results of the phylogenetic analyses (**Fig. 3**). The isolates C5-23, C6-01, C8-08 and C10-07, were not pathogenic to any cultivar, although C10-07 isolate showed 0.19 AUDPC value in ‘New Elsy’. In the cultivar ‘Mayor’, these four isolates did not show severity as opposed to the others isolates and Fod races 1 and 2 testers. This last result agree with data supported in table 2. *F. proliferatum* (isolate C4-15) produced low disease severity in cultivars ‘Eilat’ and ‘New Elsy’, although severity was significantly higher than in the control (data not shown).

**Fod race frequency and prevalence.** Taking into account all the data, we calculated the frequency and prevalence of each race in the tested area (**Table 5**). Regarding frequency, using Fod-specific primers, 31.8% (41 isolates plus C10-07) and 53.8% (71 isolates) of the total population belonged to race 1 or 8 and race 2, respectively. Thirteen of the 132 isolates showed a retarded band, where ten of these could be ascribed to *F. proliferatum*. RAPD-PCR and *TEF1- $\alpha$*  analysis showed similar results. The *TEF1- $\alpha$*  analyses identified 31.1% (41 isolates) and 56.1% (71 isolates plus C6-14, C6-15 and C7-02) of the total population to belong to race 1 or 8 and race 2, respectively.

In this study, 54 farms in 25 zones (**Table 1**) were sampled. Analysis with specific primers showed a prevalence of 38.9% and 57.6% for race 1 or 8 and race 2,

respectively. Phylogenetic analysis showed a different prevalence, 37.0% and 59.3% for race 1 or 8 and race 2, respectively.

Fod race 2 and race 1 or 8 were located together in 10 zones, but their concurrent presence was found on only one farm (11b, **Table 1**). Moreover, 11 zones displayed only Fod race 2, while 4 zones had only Fod races 1 or 8, indicating that Fod race 2 was spatially more widespread than Fod race 1 or 8 in the studied area. The presence of *F. proliferatum* was independent from that of pathogenic Fod races (farms 4b, 10c, 11c and 22a). Isolates without specific band amplification grouping in RAPD group IV (C5-22, C5-23 and C6-01) were found on the same farm (9a) together with a race 1 or 8 isolate (C5-25). Isolate C10-07, which showed a specific Fod race 1 or 8 amplification, was found on a farm, coexisting with *F. proliferatum* (22a). RAPD group VI was identified on two farms (7f, 17a) coexisting with Fod race 2 isolates. Isolates without the race 2-specific amplicon were found on the same farm (7c).

## DISCUSSION

We conclude that Fod race 2 was the most frequent and prevalent in the study area, followed by race 1 or 8, which is consistent with another study in the same region (32). However, the previous report detected a much lower frequency of race 1 than that reported here for 1 or 8. Earlier Fod race diversity reports in other Spanish regions have confirmed frequent and widespread distribution of Fod race 2 in carnation crops (3,12). However, race 8 has not been documented in Spain (3,12,32). Genetic variation studies in this region have previously shown a race structure similar to that encountered worldwide (1,6,26). Based on these data, carnations cultivars with resistance to race 2 and races 1 and 8 are the most recommended in the studied area.

Among the diagnostic protocols for *Fusarium* species, PCR assays are considered to be one of the most rapid and reliable methods (25). RAPD fingerprinting and *TEF1- $\alpha$*  sequence analyses showed strikingly similar and well-resolved clades for Fod races, both approaches complementing each other. Several studies have applied RAPD fingerprinting to identify all major races of Fod present in other countries (27,18). Regarding sequence data, the *TEF1- $\alpha$*  gene has been resolved as the most phylogenetically reliable molecular marker of the *Fusarium* genus, relative to the  $\beta$ -tubulin gene, ITS regions and *CYP51C* gene (18). Our study demonstrated that *TEF1- $\alpha$*  could be used as a molecular marker to group Fod isolates into races, this method taking less time and being more reliable than RAPD-PCR. Indeed, a previous report revealed a higher level of homoplasmy shown by RAPD-based phylogeny than the *TEF1- $\alpha$*  and mtSSU rDNA gene sequencing data, using *F. oxysporum* from maize (31). The high genetic homogeneity within the races found in this population was consistent with that reported in earlier studies (6,26).

We propose that PCR with specific primers, whose amplification is related with the *Fot1*-transposable element (13), is not sufficient to confirm the presence of Fod in a given area, due to differences in the target genomic sequences. Indeed, these markers showed variable specificity in our population, as described in a previous study (32). As an example, 13 isolates showed a retarded Fod race 1 or 8 band when the specific primers were used. Moreover, *Fot1* elements exhibit a very low level of polymorphism in the *Fusarium oxysporum* complex (14). Our data using race-specific primers showed that Fod race 8 (and probably Fod race 1) has 17 nucleotides less in this region than others *Fusarium* species. A possible horizontal transfer of *Fot1* transposon between *Fusarium* species (14) could create a deletion in this region, differentiating isolates



related to Fod from the others (i.e., *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* isolate C8-08).

Although molecular techniques were reliable, they must be validated with a phenotypic pathogenicity test. Despite the reasonable degree of disease severity found in the pathogenicity test, the assay showed results that were not expected; for example, susceptible responses in New Elsy and Eilat to race 2 and race 4, respectively. Pathogenicity tests conducted in semi-controlled conditions by Ben-Yephet and Shtienberg (7) indicated that the carnation response to Fod is substantially influenced by environmental conditions (mainly solar radiation, temperature and substrate), which could explain the results we observed.

In our pathogenicity test, the isolate C6-15 (which did not show a Fod race 2-specific band) behaved like Fod race 2 and was as virulent as other race 2 isolates, such as C6-14 and C7-02. Southern blot analysis (using *FotI* transposon as the probe) showed that two isolates generated the same restriction pattern as the Fod race 2 tester (data not shown, 13), suggesting that the absence of specific amplification was not due to a movement of *FotI*, but a change in the target sequences of these primers. Thus, we propose that the presence of these isolates (C6-14, C6-15 and C7-02) in the population could form a possible Fod race 2 subgroup. To define subgroups within Fod race 2 an extensive virulence study of isolates would have to be carried out.

Isolates selected from the seven clustered in RAPD groups IV, V and VI and TEF group IV did not show severity in any of the carnation cultivars tested. These isolates, recovered on different farms from wilted carnations, were characterized as *F. oxysporum* by *TEF1- $\alpha$*  sequencing. They may be saprophytic *F. oxysporum*, possibly associated with the carnation rhizosphere, as found in previous studies (18).

Ten isolates (7.6% of the collection) belonging to *F. proliferatum* (RAPD group IX and TEF group V) were found to be non-pathogenic in our phenotypic assay. In a similar study, seven non-pathogenic isolates of *F. proliferatum*, obtained from carnation crops in Italy, Israel and the Netherlands were clearly recognized on the basis of their RAPD fingerprint (18). However, Aloï and Baayen (1) obtained 11 isolates of *F. proliferatum* belonging to a distinct vegetative compatibility groups from Fod, which were associated with the basal rot of carnation. This fungus has also been identified as a pathogen in asparagus (37), and as an opportunistic fungus in wheat (24) and palms (16).

In conclusion, population characterization showed that Fod race 2 was widely distributed along the north-west of Cadiz, followed by race 1 or 8. Molecular techniques, such as *TEF1- $\alpha$*  sequencing or RAPD-PCR, allowed (mainly the former) a better identification and clustering of different Fod races than using Fod race-specific primers. Indeed, isolates failing to generate an amplification signal with Fod race-specific primers may indicate the presence of a Fod race 2 subgroup in this area.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-08137-C03-02), Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (P06-AGR-02313) and the Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2008-05414-C03-01) of Spain. We thank Q. Migheli for critically reading the manuscript and making valuable suggestions prior to submission, and Drs. E.T. Steenkamp and J. M. Melero-Vara for providing *F. redolens* and reference strains of Fod. We also thank M.L. Castillo and S. Castillo for their excellent technical assistance.

**LITERATURE CITED**

1. Aloï, C., and Baayen, R. P. 1993. **Examination of the relationships between vegetative compatibility groups and races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.** Plant Pathol. 2:83-850.
2. Alves-Santos, F. M., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J. M., Martín-Domínguez, R., García-Benavides, P., Crespo, M. C., Díaz-Mínguez, J. M., and Eslava, A. P. 2002. **Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece.** Plant Pathol. 51:605-611.
3. Andrés, J. L., Vicente, M. J., Cenis, J. L., Collar, J., Tello, J., and Cifuentes, D. 2001. **Genetic and pathogenic variation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Spain.** Bol. San. Veg. Plagas 27:249-257.
4. Anonymous. 2008. Anuario de Estadística Agroalimentaria. Cap. 20:20.7.2.3. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Spain.
5. Baayen, R. P., and Van der Plas, C. H. 1992. **Localization ability, latent period and wilting rate in eleven carnation cultivars with partial resistance to *Fusarium wilt*.** Euphytica 59:165–174.
6. Baayen, R. P., van Dreven, F., Krijger, M. C., and Waalwijk, C., 1997. **Genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *Fusarium redolens* f. sp. *dianthi*.** Eur. J. Plant Pathol. 103:395-408.

7. Ben-Yephet, Y., and Shtienberg, D. 1997. **Effects of the host, the pathogen, the environment and their interactions, on Fusarium wilt in carnation.** *Phytoparasitica* 25:207–216.
8. Bianciotto, V., Bandi, C., Minerdi, D., Sironi, M., Tichy, H. V., and Bonfante, P. 1996. **An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria.** *Appl. Environ. Microb.* 62:3005-3010.
9. Bogale, M., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., and Steenkamp, E. T. 2007. **Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*.** *FEMS Microbiol. Lett.* 271:27-32.
10. Cassago, A., Panepucci, R. A., Tordella-Baião, A. M., and Henrique-Silva, F. 2002. **Cellophane based mini-prep method for DNA extraction from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.** *BMC Microbiol.* 2:1-4.
11. Carbonell, C., Cifuentes, D., Tello J. and Ceñis, J. L. 1994. **Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F.o.* f. sp. *radicis-lycopersici* and its detection in plant by RAPD markers.** *Bol. San. Veg. Plagas* 20:919-926.
12. Cebolla, V., Monton, C., Carrasco, P., and Rodríguez, A. 1983. **La importancia de las razas I y II de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en los suelos españoles.**

- Jornadas sobre Patología Vegetal. Monografía INIA 48. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (ed.). Madrid, Spain.
13. Chiocchetti, A., Bernardo, I., Daboussi, M. J., Garibaldi, A., Gullino, L., Langin, T., and Migheli, Q. 1999. **Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation tissue by PCR amplification of transposon insertions.** *Phytopathology* 89:1169-1175.
  14. Daboussi, M. J., Davière, J. M., Graziani, S., and Langin, T. 2002. **Evolution of the *Fot1* transposons in the genus *Fusarium*: discontinuous distribution and epigenetic inactivation.** *Mol. Biol. Evol.* 19:510-520.
  15. Dhingra, O.D., and Sinclair, J.B. 1995. **Basic Plant Pathology Methods** (2nd Edition ed.), Lewis Publishers, Boca Raton, London, Tokyo.
  16. Elliott, M. L., Des Jardin, E. A., O'Donnell, K., Geiser, D. M., Harrison, N. A., and Broschat, T.K. 2010. ***Fusarium oxysporum* f. sp. *palmarum*, a novel forma specialis causing a lethal disease of *Syagrus romanzoffiana* and *Washingtonia robusta* in Florida.** *Plant Dis.* 94:31-38.
  17. Fernández, D., Quinten, M., Tantaoui, A., Geiger, J. P., Daboussi, M. J., and Langin, T. 1998. ***Fot 1* Insertions in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* genome provide diagnostic PCR targets for detection of the date palm pathogen.** *Appl. Environ. Microb.* 64:633-636.

18. Fernández-Ortuño, D., Loza-Reyes, E., Atkins, S. L., and Freeije, B. A. 2010. **The *CYP51C* gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the *Fusarium* species complex and a novel target for species-specific PCR.** *Int. J. Food Microbiol.* 144:301-309.
19. García Ruiz, A., De Cara, M., Santos, M., and Tello, J. C. 2009. **Fusarium wilt of carnation in northwestern coast of Cádiz (Spain).** *Bol. San. Veg. Plagas* 35:317-328.
20. Garibaldi, A., and Gullino, M. L. 1987. **Fusarium wilt of carnation: present situation, problems and perspectives.** *Acta Hort.* 216:45–54.
21. Geiser, D. M., Jiménez-Gasco, M. M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., and O'Donnell, K. 2004. **Fusarium-ID v.1.0: a DNA database for identifying *Fusarium*.** *Eur. J. Plant Pathol.* 110:473-479.
22. Kimura M. 1980. **A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.** *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
23. Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., and Tamura, K. 2008. **MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences.** *Brief. Bioinform.* 9:299-306.

24. Kwon, S. I., von Dohlen, C. D., and Anderson, A. J. 2001. **Gene sequence analysis of an opportunistic wheat pathogen, an isolate of *Fusarium proliferatum***. Can. J. Bot. 79:1115-1121.
25. Lievens, B., Rep, M., and Thomma, B. P. H. J. 2008. **Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum***. Pest Manag. Sci. 64:781-788.
26. Lori, G., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., and Alabouvette, C. 2004. **Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina**. Phytopathology 94:661-668.
27. Manulis, S., Kogan, N., Reuven, M., and Ben-Yephet, Y. 1994. **Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation**. Phytopathology 84:98-101.
28. Migheli, Q., Briatore, E., and Garibaldi, A. 1998. **Use of a random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify races 1, 2, 4 and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Italy**. Eur. J. Plant Pathol. 104:49-57.
29. Navas Becerra, J. A. 1988. **Apuntes sobre el cultivo del clavel**. Consejería de Agricultura y Pesca (ed.). Junta de Andalucía. Sevilla, Spain.

30. Link, W., Dixkens, C., Singh, M., Schwall, M., Melchinger, A. E., Jaccard, P. 1995. **Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers.** Theor Appl Genet 90:27-32.
31. O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., and Ploetz, R. C. 1998. **Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies.** P. Natl. Acad. Sci. USA. 95:2044-2049.
32. Prados-Ligero, A. M., Basallote-Ureba, M. J., López-Herrera, C. J., and Melero-Vara, J. M. 2007. **Evaluation of Susceptibility of carnation cultivars to Fusarium Wilt and determination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* races in Southwest Spain.** Hortscience 42:596-599.
33. Shafagh, N., Rastegar, M. F., and Jafarpour, B. 2008. **Physiological race and genetic diversity determination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by differential hosts and molecular marker RAPD in Northern and Razavi Khorasan provinces.** Res. Biol. Sci. 3:790-793.
34. Singleton, L. L., Mihail, J. D. and Rush, C. M., 1992. **Methods for research on soil-borne phytopathogenic fungi.** American Phytopathological Society Press. St Paul, MN, USA.



35. Van de Peer, Y., and De Wachter, R. 1994. **TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment.** *Comput. Appl. Biosci.* 10:569-570.
36. Vakalounakis, D. J., and Fragkiadakis, G. A. 1999. **Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting.** *Phytopathology* 89:161-168.
37. Yergeau, E., Filion, M., Vujanovic, V., and St-Arnaud M. 2004. **A PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to assess *Fusarium* diversity in asparagus.** *J. Microbiol. Meth.* 60:143-154.
38. Zhou, Z. Q., and Li, Y. N. 2000. **The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple.** *Genet. Resour. Crop Ev.* 47:353-357.



TABLE 1. *Fusarium oxysporum* populations from diseased carnation cultivars in the north-west of the province of Cadiz, ordered by farm.

Isolate <sup>a</sup>	Municipal Areas <sup>b</sup>	Zones <sup>c</sup>	Code zone <sup>d</sup>	Farm <sup>e</sup>	Cultivar <sup>e</sup>	Race <sup>f</sup>
C4-06	Chipiona	Espantamonos	1	1a	Ashely	R1-8
C8-13	Chipiona	Espantamonos	1	1a	Ashely	R1-8
C8-15	Chipiona	Espantamonos	1	1b	Bellami	R2
C8-23	Chipiona	Espantamonos	1	1c	Pasodoble	R1-8
C9-06	Chipiona	Espantamonos	1	1c	Pasodoble	R1-8
C4-10	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída	2	2a	Rossini	R2
C9-21	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída	2	2a	Rossini	R2
C10-06	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída	2	2a	Rossini	R2
C7-04	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída	2	2b	Báltico	R2
C7-05	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída	2	2b	Delphi	R2
C9-24	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída	2	2b	Liberty	R2
C4-13	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída Puntal del Muro	3	3a	Liberty	R1-8
C9-02	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída/Puntal del Muro	3	3b	Liberty	R2
C9-10	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída/Puntal del Muro	3	3b	Liberty	R2
C9-03	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída/Puntal del Muro	3	3c	Ivana Orange	R2
C9-04	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída/Puntal del Muro	3	3c	Ivana Orange	R2
C9-11	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída/Puntal del Muro	3	3c	Ivana Orange	R2
C4-17	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída C/C	4	4a	Gram Slam	R1-8
C4-18	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída C/C	4	4a	Gram Slam	R1-8
C10-08	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída C/C	4	4a	Gram Slam	R1-8
C4-19	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída C/C	4	4b	Orange Prestige	R2
C4-20	Sanlúcar de Barrameda	La Algaída C/C	4	4b	Orange Prestige	<b>R1-8</b>
C4-21	Chipiona	Los Rizos	5	5a	Gaudina	R1-8
C4-22	Chipiona	Los Rizos	5	5a	Gaudina	R1-8
C4-23	Chipiona	Los Rizos	5	5a	Gaudina	R1-8
C5-01	Chipiona	Los Rizos	5	5b	Liberty	R2
C5-16	Chipiona	Los Rizos	5	5b	Liberty	R2
C6-21	Chipiona	Los Rizos	5	5b	Liberty	R2
C5-05	Chipiona	Los Rizos	5	5c	While Ashley	R1-8
C5-06	Chipiona	Los Rizos	5	5c	While Ashley	R1-8
C5-03	Sanlúcar de Barrameda	Hato de la Carne	6	6a	Barbara	R1-8
C5-04	Sanlúcar de Barrameda	Hato de la Carne	6	6a	Barbara	R1-8
C6-23	Sanlúcar de Barrameda	Hato de la Carne	6	6a	Barbara	R1-8
C5-07	Chipiona	Las Machuelas	7	7a	Gaudina	R1-8
C5-08	Chipiona	Las Machuelas	7	7a	Gaudina	R1-8
C5-09	Chipiona	Las Machuelas	7	7a	Gaudina	R1-8
C5-19	Chipiona	Las Machuelas	7	7b	Pilar	R2
C5-20	Chipiona	Las Machuelas	7	7b	Pilar	R2
C5-24	Chipiona	Las Machuelas	7	7b	Pilar	R2
C6-14	Chipiona	Las Machuelas	7	7c	Pilar	NB
C6-15	Chipiona	Las Machuelas	7	7c	Pilar	NB
C7-02	Chipiona	Las Machuelas	7	7c	Pilar	NB
C7-08	Chipiona	Las Machuelas	7	7d	Capineira	R1-8
C10-11	Chipiona	Las Machuelas	7	7d	Capineira	R1-8
C10-24	Chipiona	Las Machuelas	7	7d	Capineira	R1-8
C7-09	Chipiona	Las Machuelas	7	7e	Natila	R1-8
C9-07	Chipiona	Las Machuelas	7	7e	Natila	R1-8
C10-20	Chipiona	Las Machuelas	7	7e	Natila	R1-8
C8-03	Chipiona	Las Machuelas	7	7f	Ticotico	R2
C8-04	Chipiona	Las Machuelas	7	7f	Ticotico	R2
C8-05	Chipiona	Las Machuelas	7	7f	Ticotico	R2
C10-04	Chipiona	Las Machuelas	7	7f	Ticotico	<b>R1-8</b>
C10-13	Chipiona	Las Machuelas	7	7g	Star	<b>R1-8</b>
C5-21	Chipiona	Huerta San Juan	8	8a	Eveling	R2

C6-24	Chipiona	Huerta San Juan	8	8a	Eveling	R2
C9-20	Chipiona	Huerta San Juan	8	8a	Eveling	R2
C5-22	Chipiona	Majada de las vacas	9	9a	Máster	NB
C5-23	Chipiona	Majada de las vacas	9	9a	Master	NB
C5-25	Chipiona	Majada de las vacas	9	9a	Master	R1-8
C6-01	Chipiona	Majada de las vacas	9	9a	Master	NB
C6-03	Chipiona	Majada de las vacas	9	9b	Pilar	R2
C6-04	Chipiona	Majada de las vacas	9	9b	Pilar	R2
C6-07	Chipiona	Majada de las vacas	9	9b	Pilar	R2
C6-06	Chipiona	Escalereta	10	10a	Báltico	R2
C6-08	Chipiona	Escalereta	10	10a	Báltico	R2
C10-10	Chipiona	Escalereta	10	10a	Báltico	R2
C6-09	Chipiona	Escalereta	10	10b	Maestro	R2
C6-10	Chipiona	Escalereta	10	10b	Maestro	R2
C6-25	Chipiona	Escalereta	10	10b	Maestro	R2
C7-12	Chipiona	Escalereta	10	10c	Imagine	<b>R1-8</b>
C7-13	Chipiona	Escalereta	10	10c	Imagine	<b>R1-8</b>
C7-14	Chipiona	Escalereta	10	10c	Imagine	R2
C7-17	Chipiona	Escalereta	10	10c	Imagine	R2
C7-20	Chipiona	Escalereta	10	10c	Imagine	<b>R1-8</b>
C9-18	Chipiona	Escalereta	10	10c	Imagine	R2
C10-03	Chipiona	Escalereta	10	10c	Imagine	R2
C6-11	Chipiona	Pinar Martín	11	11a	Berry	R1-8
C7-01	Chipiona	Pinar Martín	11	11a	Berry	R1-8
C6-12	Chipiona	Pinar Martín	11	11b	Medea	R1-8
C6-13	Chipiona	Pinar Martín	11	11b	Medea	R2
C8-10	Chipiona	Pinar Martín	11	11c	Rayo de Sole	R2
C8-11	Chipiona	Pinar Martín	11	11c	Rayo de Sole	R2
C10-05	Chipiona	Pinar Martín	11	11c	Rayo de Sole	<b>R1-8</b>
C6-16	Chipiona	El Olivar	12	12a	Dover	R2
C6-17	Chipiona	El Olivar	12	12a	Dover	R2
C7-03	Chipiona	El Olivar	12	12a	Dover	R2
C11-03	Chipiona	El Olivar	12	12b	Arena	R2
C7-06	Sanlúcar de Barrameda	Madre del Agua	13	13a	Firato	R2
C10-17	Sanlúcar de Barrameda	Madre del Agua	13	13a	Firato	R2
C7-11	Chipiona	Majadales	14	14a	Tempo	R2
C7-16	Chipiona	Los Llanos	15	15a	Lolita	R2
C7-18	Chipiona	Los Llanos	15	15a	Lolita	R2
C11-04	Chipiona	Los Llanos	15	15a	Lolita	R2
C10-14	Chipiona	Los Llanos/Envidio	15	15b	Claudia	R1-8
C10-15	Chipiona	Los Llanos/Envidio	15	15b	Claudia	R1-8
C10-16	Chipiona	Los Llanos/Envidio	15	15b	Claudia	R1-8
C8-02	Chipiona	Cerro Colón	16	16a	Delfi	R2
C8-06	Chipiona	Loma Baja	17	17a	Splendido	R2
C8-07	Chipiona	Loma Baja	17	17a	Splendido	R2
C8-08	Chipiona	Loma Baja	17	17a	Splendido	<b>R1-8</b>
C8-09	Chipiona	Loma Baja	17	17a	Splendido	<b>R1-8</b>
C8-19	Chipiona	Loma Baja	17	17b	Eilat	R2
C8-20	Chipiona	Loma Baja	17	17b	Eilat	R2
C8-24	Chipiona	Loma Baja	17	17b	Eilat	R2
C8-22	Sanlúcar de Barrameda	Santa Tecla	18	18a	Montezuma	R2
C8-14	Sanlúcar de Barrameda	Santa Tecla	18	18b	Tauroc	R1-8
C9-05	Sanlúcar de Barrameda	Santa Tecla	18	18b	Tauroc	R1-8
C8-21	Chipiona	Majadales alto	19	19a	Solar Oro	R1-8
C9-17	Chipiona	Majadales alto	19	19b	White Fleurette	R1-8
C11-02	Chipiona	Majadales alto	19	19c	Millenium	R2
C9-08	Rota	Peña del Águila	20	20a	Rebeca	R1-8
C4-01	Chipiona	Aulagar	21	21a	Pink Ashley	R2
C4-02	Chipiona	Aulagar	21	21a	Pink Ashley	R2
C4-03	Chipiona	Aulagar	21	21a	Pink Ashley	R2
C4-04	Chipiona	Aulagar	21	21b	Pink Ashley	R2

C7-10	Chipiona	Aulagar	21	21b	Pink Ashley	R2
C4-14	Chipiona	Monteruco	22	22a	Cerise R. Barb.	<b>R1-8</b>
C4-15	Chipiona	Monteruco	22	22a	Cerise R. Barb.	<b>R1-8</b>
C4-16	Chipiona	Monteruco	22	22a	Cerise R. Barb.	<b>R1-8</b>
C10-07	Chipiona	Monteruco	22	22a	Cerise R. Barb.	R1-8
C7-07	Chipiona	Monteruco	22	22b	Orbit	R1-8
C9-14	Chipiona	Monteruco	22	22b	Orbit	R1-8
C9-25	Chipiona	Monteruco	22	22b	Orbit	R1-8
C7-21	Chipiona	Lopina	23	23a	Nogalte	R2
C7-22	Chipiona	Lopina	23	23a	Nogalte	R2
C7-23	Chipiona	Lopina	23	23a	Nogalte	R2
C7-24	Chipiona	Lopina	23	23a	Nogalte	R2
C7-25	Chipiona	Lopina	23	23a	Nogalte	R2
C8-01	Chipiona	Lopina	23	23a	Nogalte	R2
C9-15	Chipiona	La Loma	24	24a	Spectro	<b>R1-8</b>
C9-19	Chipiona	La Loma	24	24b	Spectro	R1-8
C10-02	Chipiona	Copina	25	25a	Delphi	R2

<sup>a</sup> Names of population isolates.

<sup>b</sup> Municipal areas (Chipiona, Sanlúcar de Barrameda and Rota).

<sup>c</sup> Zones in which farms were studied.

<sup>d</sup> A random code assigned to each zone.

<sup>e</sup> Carnation cultivar finding in the corresponding farm, which isolated were obtained. Code zone with the same number but different letters means same zone but different farms.

<sup>f</sup> *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) determination using specific primers (13). R1-8: Fod race 1 or 8; R2: Fod race 2; R1-8 in bold: retarded electrophoretic mobility band; NB: non-amplified band.

TABLE 2. Response of five carnation cultivars tested to races 1, 2, 4, 6 and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

	Race 1	Race 2	Race 4	Race 6	Race 8
Eilat	R	S	R	R	R
New Elsy	S	R	R	R	R
Suprema	R	S	NT	NT	R
Reina	R	S	R	NT	NT
Mayor	S	S	NT	S	NT

R, resistant; S, susceptible; NT: not tested.

TABLE 3. Selected isolates from the RAPD study.

Isolate <sup>a</sup>	Municipal area <sup>b</sup>	Species name <sup>c</sup>	Race <sup>d</sup>	RAPD Group	TEF Group	GenBank accession <sup>e</sup>
C5-20	Chipiona	<i>F. oxysporum</i>	2	I	I	GU199330
C6-15	Chipiona	<i>F. oxysporum</i>	2	I	I	GU199333
C6-25	Chipiona	<i>F. oxysporum</i>	2	I	I	GU226824
C9-10	Sanlúcar de B.	<i>F. oxysporum</i>	2	II	I	GU226828
C6-01	Chipiona	<i>F. oxysporum</i>	NB	IV	IV	GU199332
C5-23	Chipiona	<i>F. oxysporum</i>	NB	IV	IV	GU199331
C10-07	Chipiona	<i>F. oxysporum</i>	1-8	V	IV	GU226826
C8-08	Chipiona	<i>F. oxysporum</i>	RB	VI	IV	GU226825
C4-17	Sanlúcar de B.	<i>F. oxysporum</i>	1-8	VII	III	GU199328
C4-22	Chipiona	<i>F. oxysporum</i>	1-8	VIII	III	GU199329
C10-14	Chipiona	<i>F. oxysporum</i>	1-8	VIII	III	GU226827
C4-15	Chipiona	<i>F. proliferatum</i>	RB	IX	V	GU191842
R1	Marismas de Lebrija	<i>F. oxysporum</i>	1-8	VIII	III	
R2	Chipiona	<i>F. oxysporum</i>	2	I	I	
R4	Italy	<i>F. oxysporum</i>	4	III	II	
R8	Italy	<i>F. oxysporum</i>	1-8	VIII	III	
Fr	South África	<i>F. redolens</i>	-	-	-	

<sup>a</sup> R1 (race 1), R2 (race 2), R4 (race 4), R8 (Race 8), Fr (*Fusarium redolens*).

<sup>b</sup> Municipal area as shown in Table 1.

<sup>c</sup> Determined by query and comparison with sequence databases using *TEF1-α* gene sequences.

<sup>d</sup> Race assignments using specific primers. **2**: Race 2; **NB**: No band amplification; **1-8**: Race 1 or 8; **RB**: Retarded race 1 or 8 band; **4**: Race 4.

<sup>e</sup> Accession numbers of *TEF1-α* gene sequences.

TABLE 4. Standardized AUDPC for carnation cultivars.

RAPD Group	Isolates/ Testers	Carnation cultivars				
		Suprema	Reina	New Elsy	Eilat	Mayor
I	C5-20	0.56 (0.02) a	0.34 (0.06) ab	0.23 (0.04) bc	0.67 (0.00) a	0.64 (0.02) a
I	C6-15	0.61 (0.06) a	0.43 (0.05) a	0.31 (0.02) b	0.75 (0.02) a	0.64 (0.01) a
I	C6-25	0.64 (0.03) a	0.45 (0.04) a	0.31 (0.07) b	0.74 (0.01) a	0.62 (0.01) a
II	C9-10	0.54 (0.03) a	0.47 (0.03) a	0.21 (0.03) bc	0.65 (0.02) a	0.61 (0.03) a
IV	C6-01	0.07 (0.02) bcd	0.04 (0.02) c	0.10 (0.01) cd	0.05 (0.02) c	0.03 (0.01) b
V	C5-23	0.05 (0.01) cd	0.04 (0.01) c	0.13 (0.02) cd	0.05 (0.05) c	0.02 (0.01) b
VI	C10-07	0.18 (0.06) b	0.07 (0.01) c	0.19 (0.04) bc	0.10 (0.01) c	0.01 (0.00) b
VII	C8-08	0.09 (0.02) bc	0.12 (0.04) bc	0.14 (0.02) cd	0.05 (0.01) c	0.08 (0.03) b
VIII	C4-17	0.00 (0.00) d	0.00 (0.00) c	0.56 (0.04) a	0.02 (0.01) c	0.63 (0.02) a
VIII	C4-22	0.01 (0.01) cd	0.02 (0.01) c	0.61 (0.02) a	0.02 (0.01) c	0.66 (0.02) a
IX	C10-14	0.00 (0.00) d	0.02 (0.01) c	0.58 (0.00) a	0.02 (0.01) c	0.55 (0.08) a
VIII	R1	0.01 (0.01) d	0.03 (0.01) c	0.57 (0.02) a	0.04 (0.01) c	0.54 (0.04) a
I	R2	0.50 (0.06) a	0.37 (0.04) a	0.13 (0.04) cd	0.63 (0.02) a	0.59 (0.03) a
III	R4	0.00 (0.00) d	0.13 (0.08) c	0.06 (0.02) d	0.41 (0.11) b	0.06 (0.03) b
VIII	R8	0.06 (0.01) bcd	0.05 (0.04) c	0.17 (0.01) bc	0.01 (0.01) c	0.07 (0.05) b

Each cultivar was infested using a root-dipping technique in a solution with  $10^6$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  from each isolate. Testers isolates: R1, Fod race 1; R2, Fod race 2; R4, Fod race 4 and R8, Fod race 8. For each cultivar (columns), numbers with the same letter were not significantly different according to Tukey's test at  $P < 0.05$ . In parentheses, SE of the mean ( $n=5$ )



TABLE 5. Frequency and prevalence of each race by PCR using specific primers and *TEF1- $\alpha$*  gene.

Races	<u>Specific primers</u>				Groups	<u><i>TEF1-<math>\alpha</math></i></u>			
	Frequency		Prevalence <sup>a</sup>			Frequency		Prevalence	
	Ib	Ib/Ti	F	F/tF		Ip	Ip/Ti	F	F/tF
Race 1-8	42	31.8%	21	38.9%	III	41	31.1%	20	37.0%
Race 2	71	53.8%	31	57.4%	I	74	56.1%	32	59.3%
Retarded band	13	9.8%			V (Fp)	10	7.6%	6	11.1%

<sup>a</sup> Prevalence was expressed as the ratio 'number of farms in which a specific race was found/total farm numbers', as a percentage.

Ib: Isolates with race-specific amplified band.

Ip: Isolates using TEF grouping.

Ti: Total isolates (n=132).

F: Numbers of farms in which a specific race, *F. proliferatum* or TEF group was found.

tF: Total farms (n=54).

Fp: *Fusarium proliferatum*.

## Captions of Figures

**Fig. 1.** Wilted carnation plants were collected in the north-west of the province of Cadiz. Top left: map of Andalusia showing the north-west area of the province of Cadiz. Bottom: the locations of some of the areas studied are represented in bold with code numbers and referenced in Table 1. In parentheses: numbers of isolates recovered in each zone.

**Fig. 2.** Random amplified polymorphisms DNA (RAPD) patterns of the different Fod race testers and one *F. redolens* obtained with five primers. Left: molecular weight marker (1 kb DNA ladder). Races belonging to: R1: Fod race 1; R2: Fod race 2; R4: Fod race 4; R8: Fod race 8; FR: *Fusarium redolens*.

**Fig. 3.** A: cluster analysis of the RAPD data was performed by the UPGMA method. RAPD groups are shown on the right of the tree. B: most likelihood tree was generated by TEF1- $\alpha$  gene sequencing. Evolutionary history was inferred from the maximum likelihood method based on the Kimura 2-parameter model. The tree with the highest log-likelihood (-1413.6427) is shown. TEF groups are shown on the right of the tree. The numbers on the branches are values from bootstrap analysis, in percentages, with 100 replications for both types of phylogenetic analyses.

**Fig. 4.** Agarose gel electrophoresis (1.5%) of PCR products from the genomic DNA of 12 representative RAPD group isolates, four Fod testers and one *Fusarium redolens* isolate. A: multiplex PCR in which five primers were mixed in the same reaction tube, where combinations of Ft3/R8.1, Ft3/R2.1 and Ft3/R4.2 resulted in bands of 295 (race

1/8), 564 (race 2) and 1315 bp (race 4), respectively; bands with retarded electrophoretic mobility are shown with an arrow. B: multiplex PCR products obtained with the LSU (not shown) and *Fusarium redolens*-specific primers, with a resulting band of 386 bp. C: PCR of the eubacterial primers 704f and 1495r where a 900-bp product was not amplified. Fod testers R1 (race 1), R2 (race 2), R4 (race 4) and R8 (race 8); Fr (*Fusarium redolens*) and 911 (bacterial tester). M, molecular size marker (1 kb ladder, Biotools); sizes (base pairs) are indicated on the left.

**Fig. 5.** Aligned DNA sequences of the Fot1 final portion and the inverted terminal repeat (ITR) from *F. melonis*, Fod race 8 (tester) and three isolates from our population, using primers Ft3/R8.1. A sequence complementary to the Fot1 primer in the ITR is displayed in the box. The perfect direct repeats in the ITR are given in bold.

Figure 1

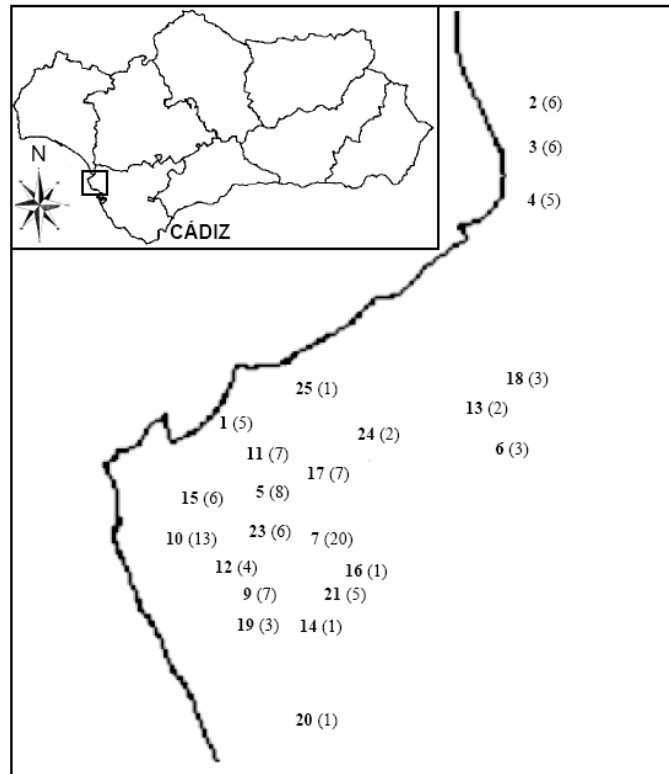


Figure 2

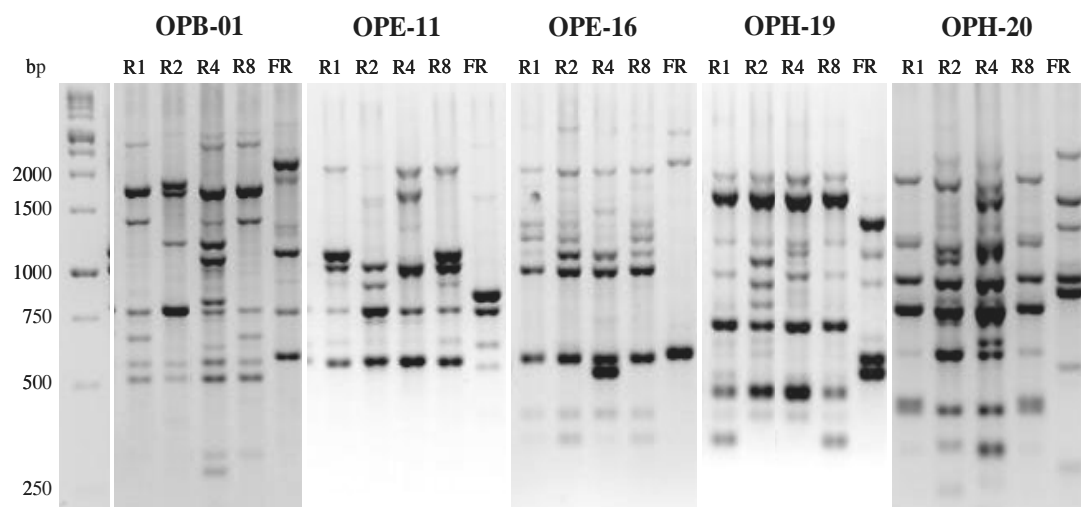


Figure 3

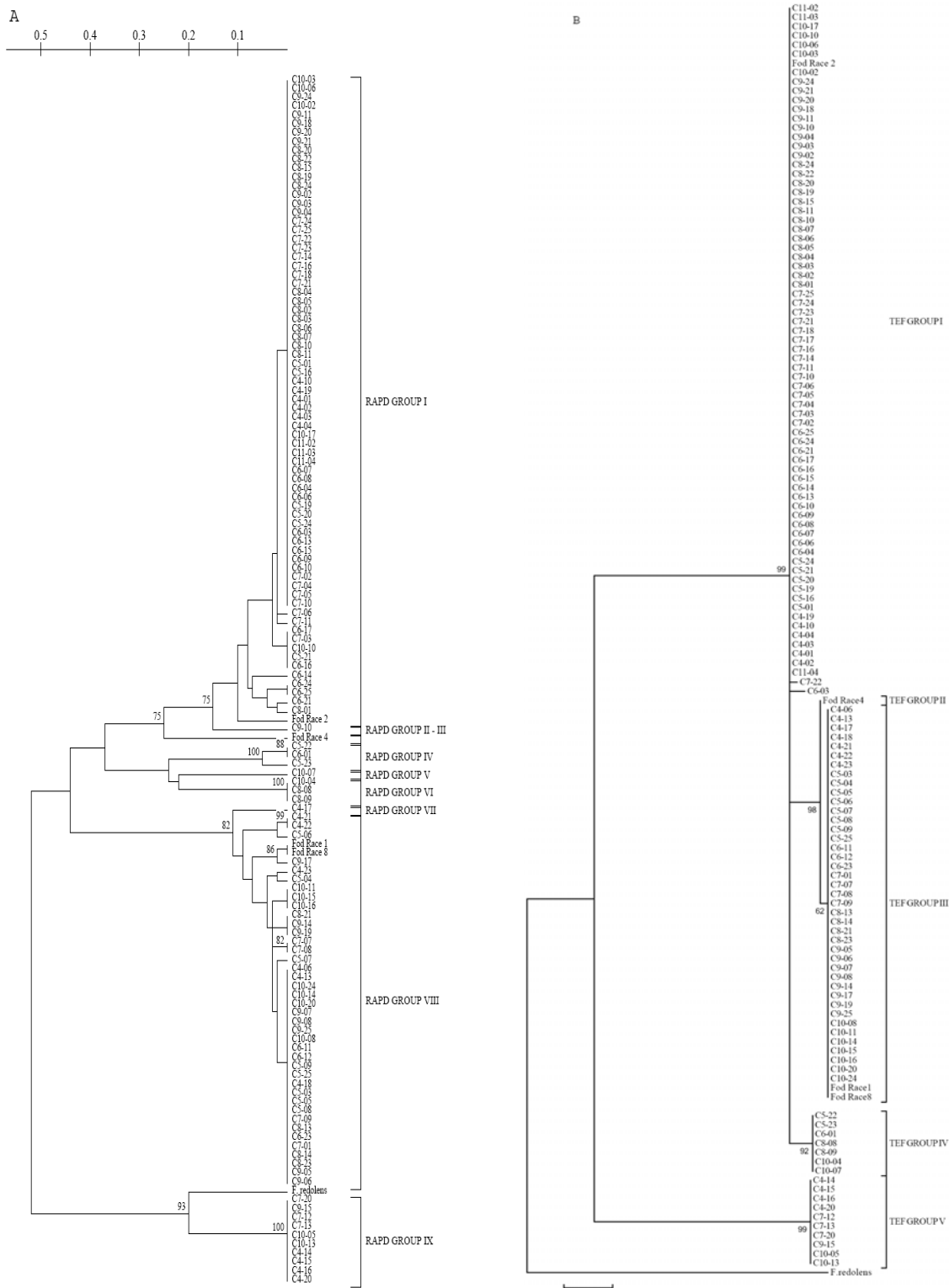
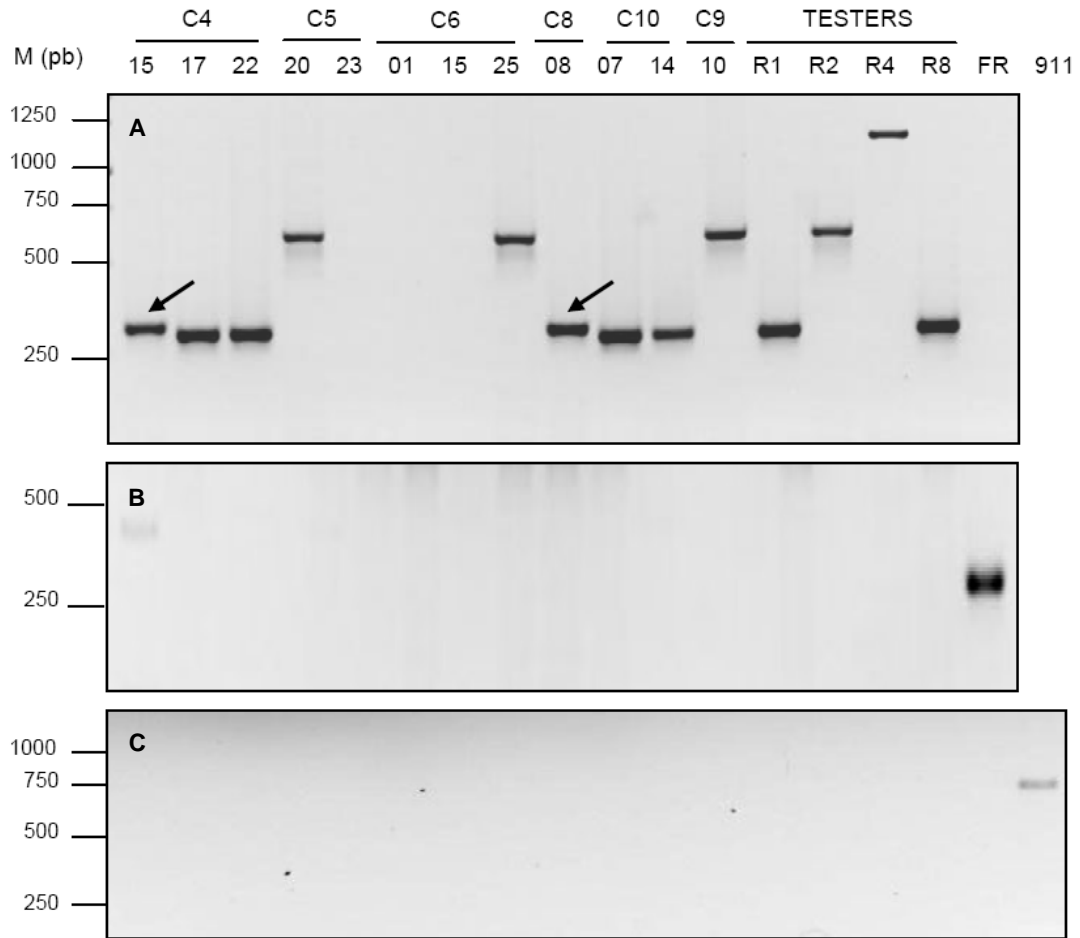


Figure 4



**Figure 5**

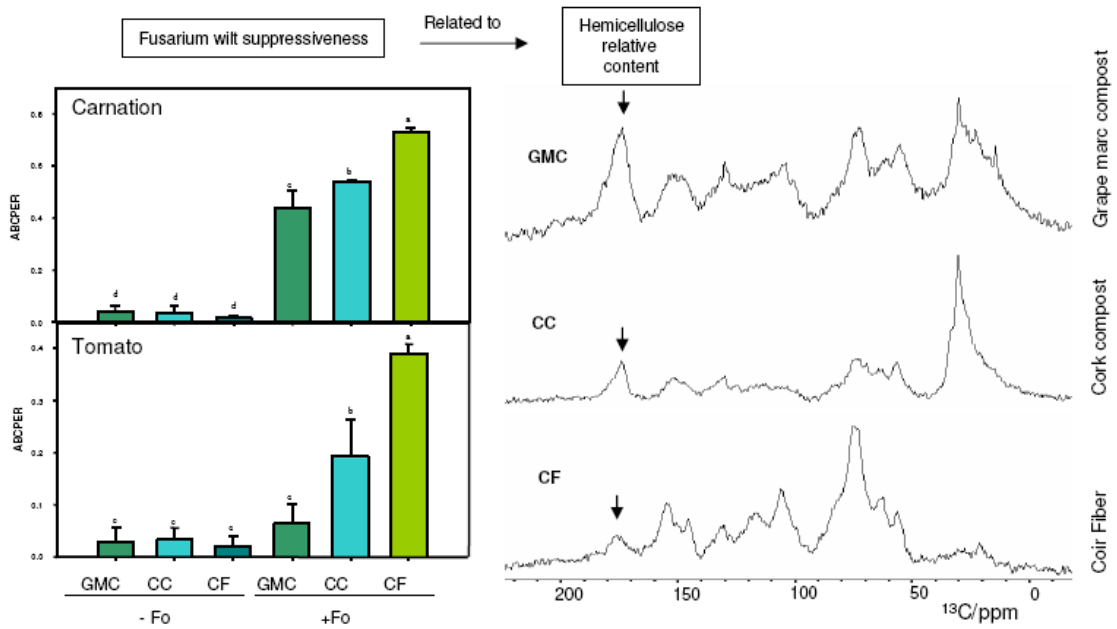
	<u>Additional sequence</u>
Isolate C4-15	3'-AAATAGATCGATGGATTTTCTGAGTCTTGCAGATGGGTCGGTTACCAGGGGGGGTTCGGTTACATGGGTGCTTGACTT-5'
Isolate C8-08	3'-AAATAGATCGATGGATTTTCTGGGTCTTGCAGATGGGTCGGTTACCAGGGGGGGTTCGGTTACATGGGTGCTTGACTT-5'
Isolate C10-07	3'-AAATAGATCGATGGATTTTCTGGGTCTTGCAGATGGGTCGGTTAC ATGGGTGCTTGACTT-5'
Isolate Fod Race 8 Tester	3'-AAATAGATCGATGGATTTTCTGAGTCTTGCAGATGGGTCGGTTAC ATGGGTGCTTGACTT-5'
Fot1-37 (terminal sequence)	3'-AAATAGATCGATGGATTTTCTGAGTCTTGCAGGTGGGTCGGTTACCAGGGGGGGTTCGGTTACATGGGTGCTTGACTT-5'



## CAPÍTULO 2

*Fracciones de la Materia Orgánica por  
Single Pulse-Magic Angle Spinning  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance y  
comunidades microbianas involucradas en la supresión de la  
Fusariosis vascular en medios de crecimiento vegetal.*

### Abstract Gráfico





FRACCIONES DE LA MATERIA ORGÁNICA POR SINGLE PULSE-MAGIC ANGLE SPINNING  $^{13}\text{C}$  NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (SP-MAS  $^{13}\text{C}$ -NMR) Y COMUNIDADES MICROBIANAS INVOLUCRADAS EN LA SUPRESIÓN DE LA FUSARIOSIS VASCULAR EN MEDIOS DE CRECIMIENTO VEGETAL.

Resumen

---

La Fusariosis vascular (FV) es una enfermedad económicamente importante en las plantas de clavel y de tomate. El uso de medios de crecimiento supresivos se ha convertido en un método alternativo para el control de enfermedades vegetales, debido a la pérdida de efectivas medidas de control químico. La supresividad a las enfermedades vegetales está sostenida sólo en los medios de crecimiento vegetal con una composición de Materia Orgánica (MO) adecuada. Los polímeros carbohidratados son las fuentes de nutrientes de carbono más importantes para las comunidades microbianas en estos medios, consistiendo principalmente de celulosa y hemicelulosa. Esto determina la actividad microbiana, la biomasa y selecciona comunidades microbianas en los medios de crecimiento vegetal, los cuales presentan factores asociados con la supresividad a la FV.

Este trabajo determina los grupos funcionales del carbono de la MO usando SP-MAS  $^{13}\text{C}$ -NMR en tres medios de crecimiento vegetal con diferentes niveles de supresividad a la FV en dos cultivos, clavel y tomate. Proponemos que el papel crítico de la MO para sostener la supresividad natural de estos medios no está relacionada con las reservas de celulosa. Esto puede ser explicado debido a que las reservas de celulosa protegidas por incrustación de lignina no están disponibles para la degradación microbiana, significando que la disponibilidad de celulosa es crítica para el mantenimiento del control biológico mediado por microorganismos. En cambio, la abundancia relativa de Hemicelulosa (pico 175 ppm) se asoció a los niveles de supresión de la FV en los medios de crecimiento estudiados.

La disponibilidad de fuentes carbonadas en la MO se relacionó a la biomasa microbiana y a la densidad poblacional de grupos econutritivos involucradas en el fenómeno del biocontrol. Para estos composts, se indicó a *Bacillus* spp, a los actinomicetos oligotrofos y celulolíticos, y las relaciones actinomicetos oligotrofos/bacterias oligotrofas y actinomicetos celulolíticos/bacterias celulolíticas como poblaciones microbianas potencialmente involucradas en la supresión.





## Organic matter fractions by SP-MAS $^{13}\text{C}$ NMR and microbial communities involved in the suppression of Fusarium wilt in organic growth media

R. Castaño <sup>a,\*</sup>, C. Borrero <sup>b</sup>, M. Avilés <sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Dpto. Ciencias Agroforestales, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, University of Seville, Ctra. Utrera km. 1, E-41013 Seville, Spain

<sup>b</sup>Biocontrol Technologies S. L. Parc Científic de Barcelona, C/Baldri Reixac, 15-21, 08028 Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 November 2010

Accepted 19 May 2011

Available online 26 May 2011

#### Keywords:

Compost

*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Hemicellulose

Coir fiber

Suppressiveness

### ABSTRACT

Fusarium wilt is an economically important disease in carnation and tomato plants. The use of suppressive plant growth media has become an alternative method for plant disease control due to the lack of effective chemical control measures. Plant disease suppressiveness is sustained only in plant growth media with an adequate organic matter (OM) composition. Carbohydrate polymers are the most important sources of carbon nutrient for microbial community in these media, mainly consisting of cellulose and hemicellulose. This determines microbial activity, biomass and selects microbial communities in plant growth media, which are reported factors associated with Fusarium wilt suppressiveness.

This work determined OM carbon functional groups using Single Pulse Magic Angle Spinning  $^{13}\text{C}$ -Nuclear Magnetic Resonance (SP-MAS  $^{13}\text{C}$ -NMR) in three plant growth media with different suppressiveness levels to Fusarium wilt in two crops, carnation and tomato. We propose that the critical role of OM to sustain naturally occurring suppressiveness in those media is not related with cellulose reserve. This could be explained because cellulose protected by lignin encrustation is not available to microbial degradation, meaning that cellulose availability is critical to sustenance of microorganism-mediated biological control. However, the hemicellulose relative abundance (peak 175 ppm) was associated to Fusarium wilt suppression level in plant growth media studied.

Carbon source availability in OM was related to microbial biomass and econutritional group population densities involved in biocontrol. For these composts, *Bacillus* spp., oligotrophic and cellulolytic actinomycetes, and oligotrophic actinomycetes/oligotrophic bacteria and cellulolytic actinomycetes/cellulolytic bacteria ratios were indicated as microbial populations potentially involved in suppression.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Fusarium wilt is a worldwide disease common to many plant species, as carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Carnation Fusarium wilt is caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and tomato Fusarium wilt by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Agrios, 2005). Control methods used to contain soilborne plant pathogens, such as fungicides, resistant cultivars and soil sterilization, produce significant problems for farmers and/or the environment. Alternative methods for disease control are biological control agents and suppressive plant growth media. According to many recent studies, growth media formulated with composts can suppress different Fusarium wilts in comparison to peat (a conducive disease medium) (Bonanomi et al., 2010). Composting is recognized as a useful practice to recycle

organic wastes. Moreover, composting offers advantages over other disposal practices and it is growing in popularity as an environmentally sound waste-treatment process, providing products with consistent properties for agriculture (Hoitink et al., 1993).

The nature of composts that are suppressive to Fusarium wilt is the result of complex interactions between the abiotic characteristics of growth media and microbial populations (Borrero et al., 2004). The effect of the organic matter (OM) decomposition level on suppressiveness efficacy suggests that OM is critical for maintaining a microbial community and its activity is capable of inducing biological control (Boehm et al., 1997). The concentration and availability of nutrients within OM play a critical role in regulating and maintaining microbial populations in conjunction with the suppressive effect of compost. Therefore, the quality of OM somehow affects the permanence of suppressive effects (Stone et al., 1997; Hoitink and Boehm, 1999).

Novel applications in spectroscopy, such as  $^{13}\text{C}$ -Nuclear Magnetic Resonance ( $^{13}\text{C}$ -NMR) spectroscopy, allow for shifts in the chemical composition of soil OM to be characterized (Forte et al., 2006). High-resolution spectroscopy of solid state samples is

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [rcastano@us.es](mailto:rcastano@us.es) (R. Castaño), [cborrero@us.es](mailto:cborrero@us.es) (C. Borrero), [aviles@us.es](mailto:aviles@us.es) (M. Avilés).

<sup>1</sup> Fax: +34 954486457.

generally made possible only through the application of Magic Angle Sample Spinning (MAS) (Cody et al., 2002). Chen and Inbar (Chen and Inbar, 1993) proposed that this non-destructive technique is a powerful tool for studies on composting, but further research is required to substantiate its ability to determine compost maturity. Although this is a new and interesting finding, its ecological significance should be elucidated and associated with the activity and structure of resident microbial communities (Pane et al., 2011). Boehm et al. (1997) used CP (cross-polarization) MAS  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy (a qualitative method) to analyze the OM composition of suppressive light peat in potting mixes with different decomposition and *Pythium* root rot suppression levels. Populations of biocontrol agents in these potting mixes decreased when carbohydrate content decline (mostly present as cellulose) while *Pythium ultimum* populations and root rot increased.

The objective of this paper was to evaluate relationships between OM fractions (mainly cellulosic and hemicellulosic substances) and Fusarium wilt suppressiveness in three plant growth media, using SP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMR data (a qualitative as well as quantitative method that should detect all organic carbons present in a sample (Cody et al., 2002)). The plant growth media employed were two composts, grape marc compost (GMC) and cork compost (CC), and a standard horticultural substrate, coir fiber (CF), with different degree of suppressiveness to Fusarium wilt of carnation and tomato.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant growth media

Two composted residues from agricultural industry waste were evaluated for carnation and tomato Fusarium wilt suppression: cork compost (CC) from industrial cork residue (bark of *Quercus suber* L.) and grape marc compost (GMC) from the alcohol distilling industry (grape skins, seeds and stems). Those residues were composted and fertilized according to Carmona et al. (2004). Composts were compared with coir fiber (CF) (Cocopeat, Projar, Valencia, Spain), a standard plant growth medium.

### 2.2. Fusarium wilt suppressiveness bioassays

Pathogen inocula were prepared with isolates of *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* race 2 (a monosporic isolate obtained from an infested carnation plant grown in Cádiz, Spain) and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 (a monosporic isolate obtained from an infested tomato plant grown in Seville, Spain). Pathogenicity of these isolates was confirmed in preliminary assays. Both pathogens were recovered from stored inoculum (silica gel 4 °C) and grown in malt broth (10 g l<sup>-1</sup>) in a 10-L fermenter Biostat B (Braun Biotech-Sartorius, Aubagne, France). The concentration of conidia was determined with haemocytometer.

Bioassays were carried out with two crops: carnation (*D. caryophyllus* cv. 'Pink Bijou') and tomato (*S. lycopersicum* cv. 'Roma'). Bioassays were performed in greenhouses with randomized complete block design and three replicates. Each bioassay was repeated twice. The experimental design involved 3 blocks × 3 plant growth media × 2 inoculated with pathogen and non-inoculated = 18 experimental units. Each experimental unit involved two bags with 30 l of plant growth medium per bag.

For the carnation bioassay, 12 plants per bag were planted (24 plants per experimental unit). Carnation plants were provided by Barberet & Blanc (Murcia, Spain) as bare-root carnation cuttings (8–12 true-leaf stage). During bioassay, plant growth media were fertilized through irrigation (fertigation) with macro- and micro-nutrient solutions: macronutrients [0.69 g H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup>, 4 g

NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup>, 3.7 g KNO<sub>3</sub> m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup>]; micronutrients [Nutrigen (Agrogen, Querétaro, Mexico) by final concentration 1 mg Mo m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup>, 2 mg Cu m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup>, 7.6 mg Mn m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup> and 10 mg Fe m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup>; 250 mg Sequestrene (Syngenta, Madrid, Spain) m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup> (6% Fe EDDHA), 11.4 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup> and 5 mg de ZnSO<sub>4</sub> m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup>]. Bioassay was conducted in a greenhouse in Chipiona (Cádiz, Spain).

For tomato bioassay, tomato seeds were sown in peat and grown in a growth chamber (27 °C, photosynthetically active radiation intensity 280 μE s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> with a 16:8 h light:dark photoperiod) for 20 days. Plants were irrigated as needed and fertigated with Peters Foliar Feed 0.25 g l<sup>-1</sup>; KCl 0.15 g l<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub> 0.6 g l<sup>-1</sup>. Three tomato plantlets (2–3 true-leaf stage) were transplanted per bag (6 plants per experimental unit). During bioassay, plant growth media were fertigated with two nutrient solutions: Solution 1 was Peters Foliar Feed 1.5 g m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup> (Scotts, Heerlen, The Netherlands), Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.15 g m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup> and MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.7 g m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup>; Solution 2 was Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.275 g m<sup>-2</sup> week<sup>-1</sup>. Plants were sprayed with Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10 g l<sup>-1</sup> (5 l per block) twice a month. Bioassay was conducted in a greenhouse in Seville (Spain).

Inoculations were made at 2·10<sup>3</sup> conidia ml<sup>-1</sup> plant growth medium for carnation bioassay and at 5·10<sup>3</sup> conidia ml<sup>-1</sup> plant growth medium for tomato bioassay. Inoculum suspensions were applied by irrigating plant growth media with the help of syringes through dripper holes. Controls were carried out with water.

Disease severity in carnation plants was scored using a symptom severity scale described by Baayen and Van der Plas (1992), where: 0 = asymptomatic plant (0% disease); 1 = weakly infected plant (5%); 2 = local base-stem symptoms (20%); 3 = unilateral and well-developed symptoms (50%); 4 = strong disease symptoms throughout the plant (80%); 5 = dead plant (100%). A similar scale was used to score disease severity in tomato plants: 0 = asymptomatic plant (0% disease); 1 = <25% affected leaves; 2 = 25–50% affected leaves; 3 = 50–75% affected leaves; 4 = >75% affected leaves; 5 = dead plant. Disease severity was monitored once and twice per week, for carnation and tomato bioassays, respectively. At each assessment, mean disease severity per experimental unit was calculated. The area under the disease progress curve standardized (AUDPCs) per experimental unit was calculated by disease severity integrated between symptoms onset and bioassay final time and divided by the total duration (days) of the epidemic in each bioassay. Therefore, AUDPCs data can range from 0 to 1. Duration of each bioassay was 3 months.

### 2.3. Characterization of plant growth media at the beginning of bioassays

In order to standardize initial conditions, GMC was previously sieved, after which, all plant growth media were incubated at a water tension of 1000 Pa (adjusted for weight) for 14 days at 25 °C. From these materials, the following measurements were performed:

Electrical conductivity (EC) and pH of plant growth media were determined according Handreck and Black (1991) with a Crison micro CM 2202 (Barcelona, Spain) conductivity meter and with a Crison GLP22 (Barcelona, Spain) pH meter, respectively (Table 1). Three samples were analyzed for each plant growth medium.

Activity of β-glucosidase was determined on plant growth media with minor modifications as described in Borrero et al. (2009). The substrate used for enzymatic reaction was p-nitrophenyl-β-D-glucoside (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA). Plant growth media samples were incubated with the substrate for one hour at 37 °C. After incubation and filtration with Albet folded filter paper DF 413 150 (Albet, Sant Boi de Llobregat, Spain), p-nitrophenyl was determined by measuring absorbance at 410 nm

**Table 1**

Chemical and biological properties and elemental composition of total C, N and S of the plant growth media evaluated at the beginning of bioassays.

	Plant growth medium <sup>A</sup>		
	GMC	CC	CF
pH	8.06 (0.03)	6.75 (0.02)	5.92 (0.05)
EC (mS/cm)	0.67 (0.01)	0.57 (0.01)	1.31 (0.02)
$\beta$ -glucosidase <sup>B</sup>	98.45 (2.87)	94.89 (1.89)	19.79 (0.90)
C (%)	37.90 (0.13)	45.91 (1.89)	43.97 (0.27)
N (%)	2.90 (0.05)	1.58 (0.08)	0.35 (0.01)
S (%)	0.23 (0.00)	0.182 (0.01)	0.06 (0.00)
C/N	13.07 (0.30)	27.50 (0.36)	124.58 (5.96)

Standard error of the mean is indicated in parentheses (pH, EC and CNS,  $n = 3$ ;  $\beta$ -glucosidase,  $n = 4$ ).

<sup>A</sup> GMC, grape marc compost; CC, cork compost; CF, coir fiber.

<sup>B</sup> enzymatic activity is expressed as  $\mu\text{g}$  hydrolyzed  $p$ -nitrophenol  $\text{cm}^{-3} \text{h}^{-1}$ .

(Uvicam UV/Vis Spectrometer UV2, Burladingen, Germany). Four samples were performed for each plant growth medium. Controls were made without substrate. The amount of  $p$ -nitrophenol released was calculated by reference to a calibration graph with standards containing known concentrations of  $p$ -nitrophenol (Panreac Quimica S.A., Barcelona, Spain). Enzyme activity results were reported in relation to dry-weight, achieved by keeping plant growth media in a heater for 24 h at 105 °C (Table 1).

Rates of total carbon, nitrogen and sulfur and the C/N ratio were determined by using a macrosample analyzer, Leco CNS-2000 (LECO Corp., St. Joseph, Michigan, USA), based on sample combustion dynamics, followed by reduction formed gases, and a triple detection system (Table 1). Three samples were analyzed for each plant growth medium. Total carbon in these materials is mostly organic due to its origin, with a similar percentage of total C for the three plant growth media. Nitrogen fertilization raised total N content in composts, with a lower C/N ratio in composts compared to CF.

Total viable cell density was determined by acridine orange direct counting (AODC). The AODC technique was performed by counting viable cells from an aqueous extraction with an epifluorescence microscope (Kepner and Pratt, 1994). Plant growth media samples (50 g) were collected and shaken with 200 ml of  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$   $1 \text{ g l}^{-1}$  (220 rpm, 20 min). Tenfold dilution series were made with  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  ( $4.460 \text{ g l}^{-1}$ ). The aqueous extraction was filtered through 0.2- $\mu\text{m}$ -pore-size black polycarbonate membranes (Isopore, Millipore Iberica S.A., Madrid, Spain). Counting was performed under microscope at  $\times 1250$  with a minimum of 400 cells per filter. Two samples were analyzed for each plant growth medium. Controls were also counted in sterile water.

The density of culturable groups of bacteria and fungi associated with the biocontrol phenomena of the plant growth media were determined by dilution plating on semi-selective media before bioassays according to Tuitert et al. (1998), with modifications as described by Borrero et al. (2005). Plant growth media (5–10 g) were suspended in 250 ml  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$   $1 \text{ g l}^{-1}$  and suspension was shaken and ten-fold dilution series were prepared with 0.1% water agar. Suspensions were pipetted onto three plates per culture medium and dilution. Four or five dilutions per series were placed on plates. For isolation of *Bacillus* spp., fluorescent *Pseudomonas* spp., oligotrophic and cellulolytic bacteria and actinomycetes, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of cycloheximide was substituted for 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of benomyl (Energía e Industrias Aragonesas, S.A., Madrid, Spain) and 0.3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of Previcur (Propamocarb, 72.2%, Schering, Alcácer, Spain). Fungal counts were made on potato dextrose agar amended with 1000 ppm of Tergitol-7 (Fluka Chemie AGB, Buchs, Switzerland) and 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of oxytetracycline hydrochloride (Sigma Chemical Company, St Louis, MO). The density of

*Fusarium* spp. and *Trichoderma* spp. in plant growth media were determined by using Komada's medium (Komada, 1975) and a *Trichoderma* medium (Chung and Hoitink, 1990), respectively. Analyses were performed two times with one sample per each plant growth medium.

The OM composition of the three plant growth media was estimated by spectral intensity integration over regions with chemical shift characteristic of different organic carbon functional groups. Single-pulse (SP) MAS  $^{13}\text{C}$  NMR experiments were recorded on a Bruker DRX400 spectrometer equipped with a multinuclear probe. Two independent replicates from each medium were analyzed. Single-pulse NMR technique is preferred to cross-polarized because it allows organic carbon functional groups from different materials to be characterized and compared. Powdered samples were packed in 4 mm zirconia rotors and spun at 10 kHz. MAS  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded at 104.26 MHz with proton decoupling, a pulse width of 2.5  $\mu\text{s}$  ( $\pi/2$  pulse length = 7.5  $\mu\text{s}$ ) and a delay time of 3 s. Chemical shift values were reported in ppm vs. a zero value arbitrarily determined for tetramethylsilane (TMS). Spectra were divided into chemical shift regions according to Knicker et al. (2006); the six regions were: 0–45 (aliphatic structures region), 45–60 (methoxy groups region), 60–110 (polysaccharide structures region), 110–160 (aromatic structures region), 160–190 (carboxyl and ester groups region) and 190–220 (cetonic groups region). Relative quantities of chemical shift regions were calculated by integrating the different spectral regions which were expressed as a percentage. In order to resolve peaks, spectra were fitted with Gaussian peaks using deconvolution. The thirteen principal peaks were quantified integrating from peak valley to valley. Percentages of regions and peaks were calculated with the program Peakfit (version 4.12, Seasolve Software Inc.). Information about decomposition levels in plant growth media, O-alkyl/aromatic and alkyl/O-alkyl ratios were also calculated (Forte et al., 2006). Lignin-like structures, guaiacyl (145–150 ppm) and syringyl (150–153 ppm), present in the different plant growth media were also calculated (Maciel et al., 1981).

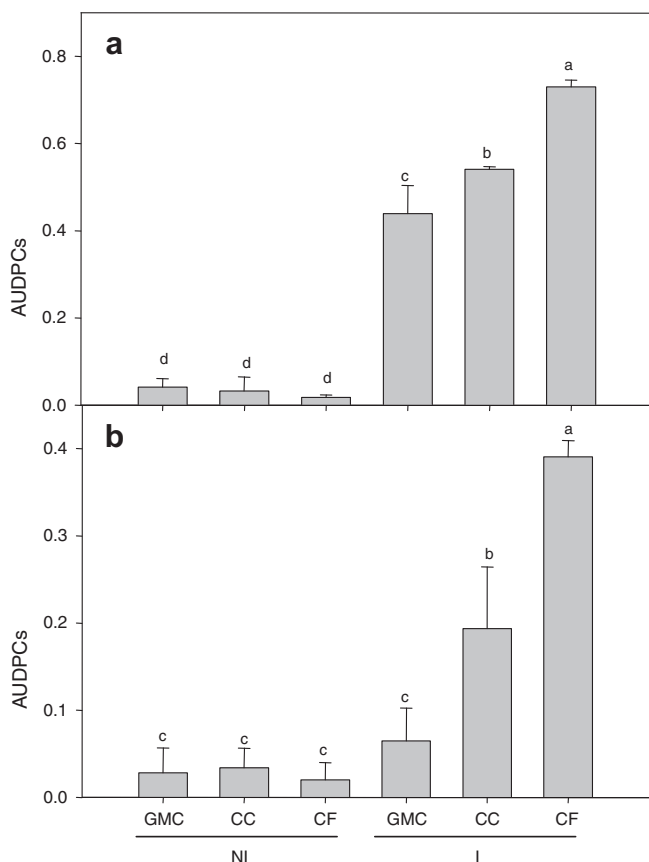
#### 2.4. Statistical analysis

Density of culturable groups of bacteria and fungi and data from NMR were analyzed using one-way ANOVA. Disease severity for each crop (AUDPCs) was analyzed using two-ways ANOVA. Terms included in the model were: A factor) growth media  $\times$  inoculated and non-inoculated (six levels); B factor) blocks (three levels) and their interaction. Data from two assays for each crop were pooled for final analysis after finding no significant A factor  $\times$  assay interaction in a preliminary analysis of variance. Significant means were compared by LSD test ( $P < 0.05$ ). All analyses were made with Statgraphics Plus (version 5.1; Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, 2002).

### 3. Results

#### 3.1. The suppressive effect in different plant growth media

Symptoms developed first in CF in both bioassays. Wilts appeared about 15 and 10 days earlier in CF than in GMC for carnation and tomato bioassays respectively. The standardized area under disease progress curve (AUDPCs) at the end of suppressive bioassays is shown in Fig. 1. Suppressiveness bioassays indicated that infested composts had a significant suppressive effect on *Fusarium* wilt compared to CF for carnation (Fig. 1a) and tomato (Fig. 1b). Severity data showed CF as a very conducive plant growth medium for *Fusarium* wilt in both crops. Grape marc compost was the most suppressive plant growth medium for *Fusarium* wilt in



**Fig. 1.** Standardized area under disease progress curve (AUDPCs) for carnation (a) and tomato (b) plants cultured in three plant growth media (GMC, grape marc compost; CC, cork compost; CF, coir fiber) under greenhouses. Each plant growth medium was artificially infested (I) or not (NI) with its corresponding pathogen (*F. oxysporum* f. sp. *dianthi* race 2 and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 for carnation and tomato, respectively). Bars with the same letters were not significantly different according to LSD test at  $P < 0.05$ . Standard error of mean is indicated by a vertical line ( $n = 6$ ).

both pathosystems, with CC showing intermediate suppressiveness. Plants in non-infested growth media (control) developed properly and did not show symptoms of Fusarium wilt, but only showed certain natural senescence in basal leaves (Fig. 1).

### 3.2. Organic fractions composition in plant growth media determined by solid-state SP-MAS $^{13}\text{C}$ NMR

Plant growth media spectra and assignment of the principal peaks are represented in Fig. 2a. Relative integration values for the six specific organic carbon regions and for the thirteen principal peaks are shown in Fig. 2b and Table 2, respectively.

No significant differences for plant growth media methoxy groups (45–60 ppm), aromatic structures (110–160 ppm) or cetonic group (190–220 ppm) regions were found (Fig. 2b). Peaks included in these regions, 55, 130 and 200 ppm, did not show significant differences in plant growth media (Table 2). With regard to aromatic structure region, characteristic of lignin-like structures, peak at 116 ppm showed lower relative abundance in composts than in CF. Although, CC had higher values at 150 ppm than the other plant growth media (Table 2).

Significant differences in the other three carbon functional groups were also found (Fig. 2b). Functional groups associated with the aliphatic structure region (0–45 ppm), generally ascribed to lipids, waxes, terpenoids, cutins and suberins (Forte et al., 2006), showed higher relative abundance in composts than in CF

(Fig. 2b). When comparing composts, CC showed the highest values in this region. Peaks included in this region with chemical changes resonating at 15, 22 and 30 ppm were observed. Significant differences in the peak at 15 ppm, with relative abundance higher in composts than in CF, were found. Significant differences at 22 and 30 ppm with higher values in CC with regard to other plant growth media were found, with GMC showing intermediate values (Table 2).

In the carbohydrate or polysaccharide structure region (60–110 ppm), CF medium had higher relative abundance than both composts (Fig. 2b). Typical compounds found in this region include polysaccharides, aminosugars, aminoacids, lignin substitutes and others (Forte et al., 2006). Relevant peaks in this region resonate at 64, 75, 84 and 103 ppm (Table 2). Coir fiber presented higher significant values at 75 and 103 ppm than in both composts. Peak at 64 ppm showed CF with higher values than GMC, while CC showed no differences with regard to other plant growth media. Peak at 84 ppm did not show significant differences between plant growth media (Table 2).

The carboxyl and ester group region (160–190 ppm) is represented by numerous chemical structures, such as amides, carboxyls, esters of proteins, lignin, hemicellulose, cutins, suberins, tannins, etc. (Forte et al., 2006). Grape marc compost showed the highest relative abundance for this region, (Fig. 2b). Peak resonating at 175 ppm, associated with carboxylic carbons of acetyl groups attached to hemicelluloses, had higher values in GMC followed by CC and finally CF (Table 2).

However, CF showed higher O-alkyl/aromatic ratio and lower alkyl/O-alkyl ratio than composts (Table 2) and presented the highest relative intensity values for guaiacyl and siringyl lignin structures (Table 3).

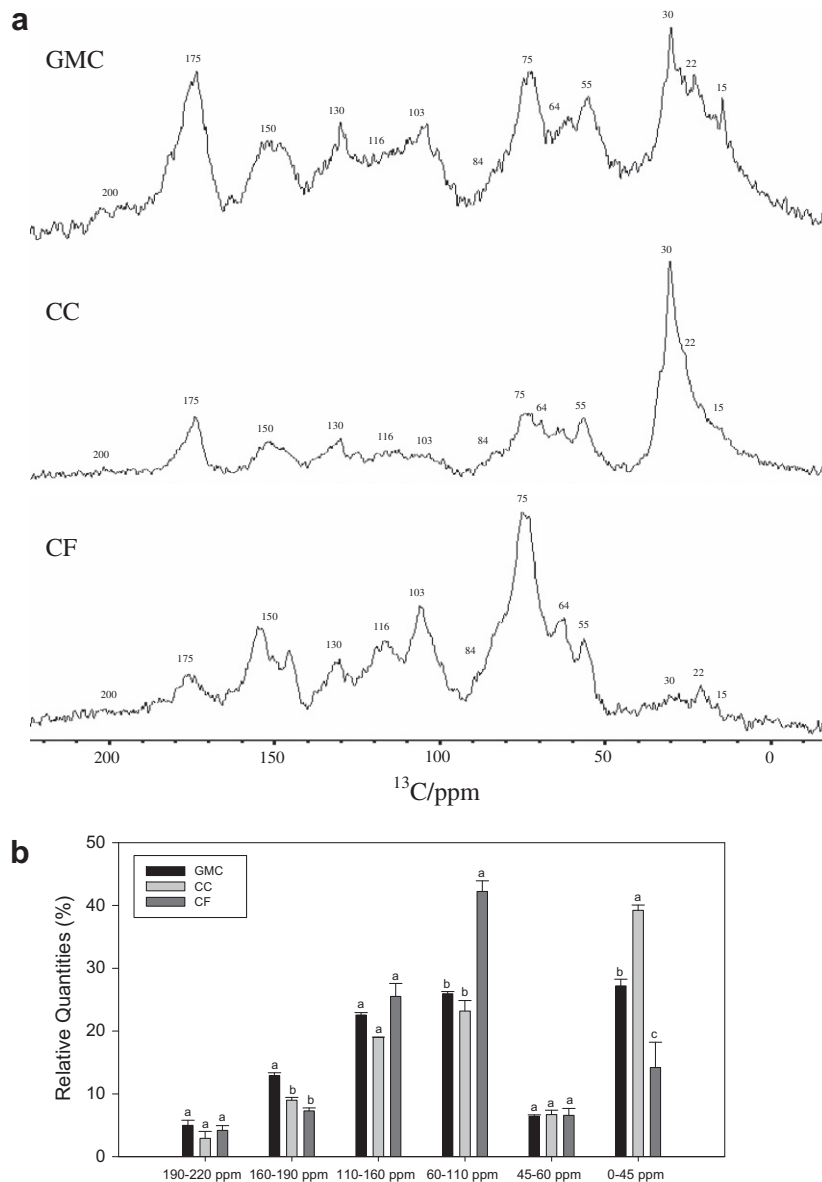
### 3.3. Microbial biomass and communities of plant growth media at the beginning of bioassays

Data from biomass (AODC) were higher in composts than in CF (Table 4). The high AODC found in two composts, 7- or 8-fold that in CF indicates extensive microbial colonization in these materials. These data agree with enzymatic data from  $\beta$ -glucosidase activity in these plant growth media (Table 1). No significant differences were detected in *Fusarium* spp., fungi or fluorescent *Pseudomonas* spp. populations densities among the plant growth media studied (Table 4). Detectable levels of *Trichoderma* spp. were found in CC. Higher population densities of *Bacillus* spp. and oligotrophic actinomycetes were obtained in composts, compared to CF. Nevertheless, the highest oligotrophic bacteria population density was found in CC, CF showing an intermediate value between two composts. Regarding cellulolytic organisms, there were no significant differences in plant growth media cellulolytic bacteria populations. However, the highest cellulolytic actinomycetes population density and ratios between oligotrophic actinomycetes/oligotrophic bacteria and cellulolytic actinomycetes/cellulolytic bacteria were found in GMC.

## 4. Discussion

Results of Fusarium wilt suppression in tomato and carnation from compost windrows included in this work are results obtained with similar residues from different and previous batches (Borrero et al., 2004, 2006, 2009). Grape marc compost was the most suppressive, CC intermediate and CF the most conducive plant growth medium. As in these materials, previous studies reported consistent positive correlations between both pH and  $\beta$ -glucosidase activity and Fusarium wilt suppression (Borrero et al., 2004, 2009). This enzymatic activity is determined by carbon source





**Fig. 2.** Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (a) and distribution of organic carbon functional groups (b) in different plant growth media (GMC, grape marc compost; CC, cork compost; CF, coir fiber). Values above spectra correspond to peaks derived from peak deconvolution allocated to each region. Under graph. 0–45 ppm, aliphatic structure region; 45–60 ppm, methoxy group region; 60–110 ppm, polysaccharide structures region; 110–160 ppm, aromatic structure region; 160–190 ppm, carboxyl and ester groups region; 190–200 ppm, cetonic group region. Bars with the same letters were not significantly different according to LSD test at  $P < 0.05$ . Standard error of mean is indicated by a vertical line ( $n = 2$ ).

availability in plant growth media (Hoitink and Boehm, 1999). Thus, organic carbons composition of these plant growth media can be relevant.

Coir fiber lower relative abundance for aliphatic structure region (0–45 ppm) and higher O-Al/Ar and lower Al/O-Al ratios indicate a lower decomposition level with regard to composts (Preston et al., 1989; Forte et al., 2006; Spaccini and Piccolo, 2008; Pane et al., 2011). It has been suggested that a high percentage of aliphatic region intensity values in humic acids are due to algal and microbial lipids from organisms involved in the decomposition process (Hatcher et al., 1983; Hammond et al., 1985; Pane et al., 2011) and to plant lipid compounds, such as waste and aliphatic biopolyesters (Webster et al., 1997). High levels of relative abundance found in aliphatic structure region of these composts may be due to debris from organisms alive during composting process. Generally, composts are more associated with plant suppressive

phenomena than fresh organic wastes (Hoitink and Boehm, 1999; Bonanomi et al., 2010).

The effect of OM decomposition level on efficacy of biocontrol agents suggests that OM is critical for maintaining a microbial community and its activity is capable of inducing biological control (Boehm et al., 1997; Hoitink and Boehm, 1999). According to Hoitink et al. (1993), plant disease suppressiveness is sustained only in plant growth media with an “adequate” microbial carrying capacity and with “carbohydrate” polymer reserves, mainly consisting of cellulose and hemicellulose (Chen and Inbar, 1993). In previous works, variations in polysaccharide structures region have been estimated for a determined material which lost suppressiveness in time. In this sense, Boehm et al. (1997) demonstrated by means of CP-MAS  $^{13}\text{C}$  NMR that carbohydrate concentrations, mostly determined as cellulose, decreases in a suppressive light peat mix until suppressiveness is lost. The present work is focused

**Table 2**

Relative abundance (percentage) of the thirteen most important peaks and relations between regions obtained from the NMR data from the plant growth media studied.

ppm	Species <sup>A</sup>	Plant growth medium <sup>B</sup>			References <sup>C</sup>
		GMC	CC	CF	
15	HA	4.17 (0.37) a	4.7 (0.69) a	1.65 (0.56) b	Agrios (2005), Baayen and Van der Plas (1992)
22	HA,H	5.78 (0.12) b	8.40 (0.12) a	3.74 (0.92) c	Adair et al. (2008), Baayen and Van der Plas (1992)
30	HA,H	8.19 (0.83) b	23.87 (2.58) a	3.16 (0.82) c	Agrios (2005), Albrecht et al. (2008), Baayen and Van der Plas (1992)
55	HA,L	6.07 (0.68) a	8.38 (0.83) a	7.75 (2.43) a	Adair et al. (2008), Albrecht et al. (2008), Baayen and Van der Plas (1992), Berg and McClaugherty (2003)
64	C,H,L	5.06 (0.44) b	5.79 (0.46) ab	7.62 (0.42) a	Adair et al. (2008), Agrios (2005), Albrecht et al. (2008), Baayen and Van der Plas (1992), Berg and McClaugherty (2003)
75	HAC,H,L	8.37 (0.54) b	9.37 (0.09) b	16.91 (1.56) a	Abad et al. (2002), Adair et al. (2008), Albrecht et al. (2008), Baayen and Van der Plas (1992), Berg and McClaugherty (2003)
84	C,L	3.64 (0.07) a	2.84 (0.00) a	3.43 (0.00) a	Adair et al. (2008), Albrecht et al. (2008), Baayen and Van der Plas (1992)
103	C,H,L	5.29 (0.27) b	4.45 (0.39) b	10.43 (1.37) a	Abad et al. (2002), Adair et al. (2008), Albrecht et al. (2008), Baayen and Van der Plas (1992)
116	HA,L	3.95 (0.15) b	3.88 (0.01) b	7.34 (0.18) a	Adair et al. (2008), Agrios (2005), Albrecht et al. (2008), Baayen and Van der Plas (1992), Berg and McClaugherty (2003)
130	HA,L	4.52 (0.24) a	4.79 (0.45) a	5.89 (0.00) a	Adair et al. (2008), Agrios (2005), Albrecht et al. (2008), Baayen and Van der Plas (1992), Berg and McClaugherty (2003)
150	HA,L	4.44 (0.24) b	6.23 (0.12) a	5.06 (0.18) b	Adair et al. (2008), Agrios (2005), Albrecht et al. (2008), Baayen and Van der Plas (1992), Berg and McClaugherty (2003)
175	HA,H	8.63 (0.04) a	7.90 (0.16) b	4.72 (0.03) c	Adair et al. (2008), Agrios (2005), Albrecht et al. (2008), Baayen and Van der Plas (1992), Berg and McClaugherty (2003)
200	HA	1.45 (0.07) a	1.16 (0.16) a	1.71 (0.41) a	Adair et al. (2008), Agrios (2005), Baayen and Van der Plas (1992)
O-Al/Ar <sup>D</sup>		1.44 (0.05) b	1.46 (0.03) b	1.92 (0.13) a	Albrecht et al. (2008)
Al/O-Al <sup>D</sup>		0.84 (0.02) b	1.32 (0.13) a	0.30 (0.09) c	Albrecht et al. (2008)

Within each file, values with different letters are significantly different according to LSD test at  $P < 0.05$ .

Within each file, values with different letters are significantly different according to LSD test at  $P < 0.05$  ( $n = 2$ ). Analysis of variance was performed with transformed data in peak 15  $x^{1.04}$ ; peak 22  $x^{3.5}$ ; peak 30  $x^{0.42}$ ; peak 55  $x^{-0.72}$ ; peak 64  $x^{1.14}$ ; peak 75  $x^{-1.6}$ ; peak 84  $x^{1.0}$ ; peak 103  $x^{-0.73}$ ; peak 116  $x^{-1.29}$ ; peak 130  $x^{9.9}$ ; peak 150  $x^{2.05}$ ; peak 175  $x^{-0.54}$ ; peak 200  $x^{1.01}$ ; O-Al/Ar ratio  $x^{-3.53}$ ; Al/O-Al ratio  $x^{1.0}$ .

Standard error of mean is indicated in parentheses.

<sup>A</sup> Species reported to possess a chemical shift. HA, humic acid; C, cellulose; H, hemicellulose; L, lignin.

<sup>B</sup> GMC, grape marc compost; CC, cork compost; CF, coir fiber.

<sup>C</sup> References reported.

<sup>D</sup> O-Al, O-alkyl; Ar, aromatic; Al, alkyl.

**Table 3**

Carbon distribution percentage in guaiacyl (145–150 ppm) and syringyl (150–153 ppm) regions for three plant growth media.

Plant growth medium <sup>A</sup>	Guaiacyl region (145–150 ppm)	Syringyl region (150–153 ppm)
GMC	2.49 (0.01) b	1.63 (0.03) b
CC	2.22 (0.04) b	1.61 (0.09) b
CF	2.96 (0.02) a	1.98 (0.01) a

Within each column, values with different letters are significantly different according to LSD test at  $P < 0.05$ . Standard error of mean is indicated in parentheses.

<sup>A</sup> GMC, grape marc compost; CC, cork compost; CF, coir fiber.

in analyzing carbon composition from three plant growth media with different suppressive responses to *Fusarium* wilt.

Polysaccharide structures region (60–110 ppm) (Forte et al., 2006; Spaccini and Piccolo, 2008) for CF showed relative abundance statistically higher than those of composts. Despite the high values of the polysaccharide structure region of this material, CF showed the lowest microbial activity (Table 1) and colonization (AOC) (Table 4). In some organic materials, large amount of cellulose is physically protected by lignin encrustation that make cellulose not available for degradation (Berg and McClaugherty, 2003; Adair et al., 2008). Moreover, *p*-hydroxybenzoic acid substituted to wall polymers of coconut coir would contribute to the formation of associations between polysaccharides (cellulose, mainly) and lignin (Suzuki et al., 1998), becoming part of the carbon in coir dust resistant to microbial degradation (Abad et al., 2002). The rate of the degradation of cellulose protected by lignin becomes limited by the decomposition rate of lignin (Adair et al., 2008).

However, the aromatic structure region (110–160 ppm), did not show significant differences between the three plant growth media

due to lignin aromatic rings and the peak at 55 ppm, attributed to methoxy carbons of lignin origin (Maciel et al., 1981; Chen and Inbar, 1993; Forte et al., 2006; Albrecht et al., 2008). Higher values for guaiacyl and syringyl regions in CF (Table 3), two basic building lignin blocks (Chen and Inbar, 1993) indicated the recalcitrant nature of this material. High content of lignin-like structures may mask values in the carbohydrates region, hindering a possible positive correlation between relative abundance of this region and a possible suppressive effect. Regarding carbohydrates and lignin-like structures data, NMR data from CF at the 60–110 ppm region (Fig. 2b) and from the suppressiveness bioassay (Fig. 1) do not support results provided by Stone et al. (1997) who, using DRIFT spectroscopy, determined that the concentration of cellulose and lignins in composted manure define longevity of suppressive effect. This probably means that cellulose availability to microorganisms is important besides cellulose content.

Both composts showed higher relative abundance at 15, 22 and 30 ppm (aliphatic structure region) and lower at 75, 103 and 116 ppm (polysaccharide structures and aromatic regions) respect to CF. Methyl and carboxylic carbons of acetyl groups attached to the hemicellulose resonate at 22 and 175 ppm, respectively (Forte et al., 2006). Peak resonating at 175 ppm (included in carboxyl and ester group region) was the only peak which relative abundance was associated with suppressiveness (Fig. 1 and Table 2). In a previous work, carboxylic region ranged from 165 to 188 ppm had been negatively correlated with damping-off severity associated to *P. ultimum* (Trow) on *Lepidium sativum* L. (Pane et al., 2011); it is known that this pathogen is sensitive to microbiostasis (Hoitink et al., 1993).

Composts showed higher *Bacillus* spp. and oligotrophic actinomycetes populations. These groups had been reported as populations related to suppressiveness in several composts and

**Table 4**

Acridine orange direct counting and population densities of econutritive microorganisms groups in the plant growth media at the beginning of the bioassays.

Plant growth medium <sup>A</sup>	AODC x 10 <sup>5</sup> (number of cells cm <sup>-3</sup> ) <sup>B</sup>	FUS <sup>C</sup> x 10 <sup>5</sup> (CFU cm <sup>-3</sup> )	F	FP	T	B	OA	OB	CA	CB	OA/OB	CA/CB
GMC	186.7 a	0.006 a	0.07 a	0.002 a	0.000 b	11.9 a	15.6a	24.30 c	16.59 a	24.99 a	0.64 a	0.66 a
CC	153.5 a	0.000 a	0.74 a	0.003 a	0.002 a	6.78 a	9.73 a	114.05 a	1.62 b	12.66 a	0.08 b	0.13 b
CF	12.7 b	0.001 a	0.99 a	0.001 a	0.000 b	1.56 b	0.61 b	50.06 b	1.50 b	30.31 a	0.01 b	0.05 b

Within each column, values with different letters are significantly different according to the LSD test at  $P < 0.05$ . Standard error of the mean is indicated in parentheses. Analysis of variance was performed with transformed data with  $\ln(x)$  for AODC, B, F, OA, OB, CA, CB; in  $\ln(x + 0.003)$  for T, FUS, FP; and in  $\arcsin(x)^{0.5}$  for CA/CB and OA/OB ( $n = 2$ ).

<sup>A</sup> GMC, grape marc compost; CC, cork compost; CF, coir fiber.

<sup>B</sup> AODC = Acridine orange direct counting.

<sup>C</sup> FUS = *Fusarium* spp.; F = fungi; FP = fluorescent *Pseudomonas* spp.; T = *Trichoderma* spp.; B = *Bacillus* spp.; OA = oligotrophic actinomycetes; OB = oligotrophic bacteria; CA = cellulolytic actinomycetes; CB = cellulolytic bacteria.

amendments (Tuitert et al., 1998; Borrero et al., 2004, 2005; Garbeva et al., 2006). The higher values of cellulolytic actinomycetes and ratios OA/OB and CA/CB found in GMC indicated a greater actinomycete predominance respect to bacteria in microbial community regarding CC, and most clearly to CF. Actinomycetes, besides products resulting from the degradations of carbohydrates, could also consume the breakdown products of hemicellulose (Sole-Mauri et al., 2007). This agrees with a higher relative abundance of peak resonating at 175 ppm in GMC, characteristic of hemicellulose. Moreover, previous works reported positive relations of actinomycetes populations with suppressiveness to plant diseases when organic matter was added as composted wastes (Tuitert et al., 1998; Escudra and Amemiya, 2008). The highest oligotrophic bacteria population was found in CC, but densities of this group are not considered a reliable suppressive parameter (Borrero et al., 2005), due to the lack of correlation between population density and tomato disease severity in different plant growth media.

## 5. Conclusions

In view of results, using SP MAS <sup>13</sup>C NMR technique for characterization of organic matter from organic plant growth media can provide us information about a possible suppressive behavior of these composts. However, interpretation of their results is not simple. Thus, cellulose could be physically protected by lignin (encrustation) and not available to microbial degradation, not contributing to microorganisms maintenance involved in suppressive phenomena. Carboxyl and ester group region (160–190 ppm) can be regarded as a better suppressiveness index than polysaccharide structures region (60–110 ppm) in this work. Our results indicate that the level of hemicellulose could be associated with Fusarium wilt suppression levels to carnation and tomato in three plant growth media studied, and to maintenance of a specific microbial community, as *Bacillus* spp., oligotrophic and cellulolytic actinomycetes, and oligotrophic actinomycetes/oligotrophic bacteria and cellulolytic actinomycetes/cellulolytic bacteria ratios.

## Acknowledgments

This research was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-08137-C03-02), Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (P06-AGR-02313) and Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2008-05414-C03-01) of Spain. We thank M.L. Castillo, S. Castillo and J. Rojo for excellent technical assistance.

## References

Abad, M., Noguera, P., Puchades, R., Maquieira, A., Noguera, V., 2002. Physico-chemical and chemical properties of some coconut coir dusts for use as a peat

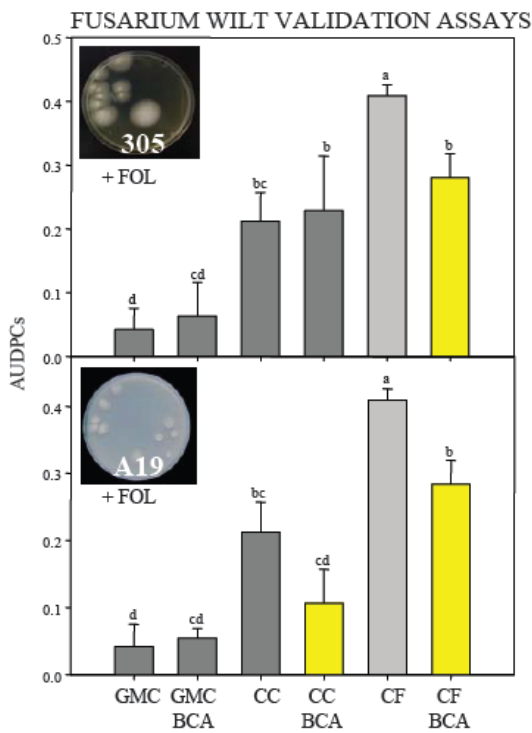
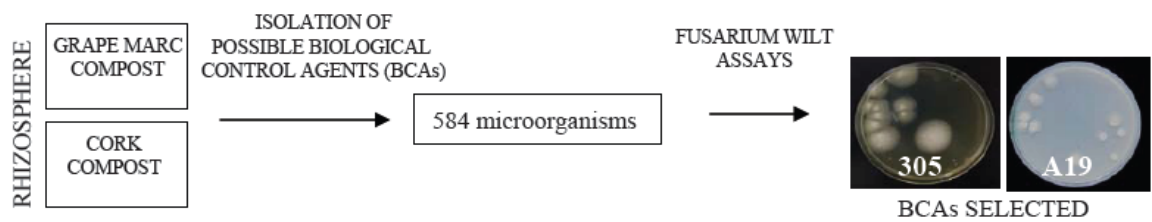
- substitute for containerised ornamental plants. *Bioresource Technology* 82, 241–245.
- Adair, E.C., Parton, W.J., Del Grosso, S.J., Silver, W.L., Harmon, M.E., Hall, S.A., Burke, I.C., Hart, S.C., 2008. A simple three-pool model accurately describes patterns of long term litter decomposition in diverse climates. *Global Change Biology* 14, 2636–2660.
- Agrios, G.N., 2005. *Plant Pathology*, fifth ed. Academic Press, USA.
- Albrecht, R., Ziarelli, F., Alarcón-Gutiérrez, E., Le Petit, J., Terrom, G., Perissol, C., 2008. <sup>13</sup>C solid-state NMR assessment of decomposition pattern during co-composting of sewage sludge and green wastes. *European Journal of Soil Science* 59, 445–452.
- Baayen, R.P., Van der Plas, C.H., 1992. Localization ability, latent period and wilting rate in eleven carnation cultivars with partial resistance to Fusarium wilt. *Euphytica* 59, 165–174.
- Berg, B., McLaugherty, C., 2003. *Plant litter. Decomposition, humus formation, carbon sequestration*, second ed. Springer, Berlin.
- Boehm, M.J., Wu, T., Stone, A.G., Kraakman, B., Iannotti, D.A., Wilson, G.E., Madden, L.V., Hoitink, H.A.J., 1997. Cross-Polarized Magic-Angle Spinning <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance spectroscopic characterization of soil organic matter relative to culturable bacterial species composition and sustained biological control of Pythium root rot. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 162–168.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F., 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 136–144.
- Borrero, C., Trillas, M.I., Ordoñez, J., Tello, J.C., Avilés, M., 2004. Predictive factors for the suppression of Fusarium wilt of tomato in plant growth media. *Phytopathology* 94, 1094–1101.
- Borrero, C., Infantes, M.J., González, E., Tello, J.C., Avilés, M., 2005. Relation between suppressiveness to tomato Fusarium wilt and microbial populations in different growth media. *Acta Horticulturae* 697, 425–430.
- Borrero, C., Ordoñez, J., Trillas, M.I., Avilés, M., 2006. Tomato Fusarium wilt suppressiveness. The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities as characterised by Biolog<sup>®</sup>. *Soil Biology Biochemistry* 38, 1631–1637.
- Borrero, C., Trillas, M.I., Avilés, M., 2009. Carnation Fusarium wilt suppression in four composts. *European Journal of Plant Pathology* 123, 425–433.
- Carmona, E., Avilés, M., Domínguez, I., Moreno, M.T., Pajuelo, P., Ordoñez, J., 2004. Exploitation of composted agricultural wastes as growing media. In: Bernal, M.P., Moral, R., Clemente, R., Paredes, C. (Eds.), *Sustainable Organic Waste Management for Environmental Protection and Food Safety*, vol. I. Ramirán 2004. Proceedings of the 11th International Conference of the FAO ESCORENA Network on the Recycling of Agricultural Residues in Agriculture, 2004. Murcia, Spain, pp. 141–144.
- Chen, Y., Inbar, Y., 1993. Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting in relation to compost maturity. In: Hoitink, H.A.J., Keener, H.M. (Eds.), *Science and Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiological and Utilization Aspects*. Renaissance, Worthington, OH, pp. 551–600.
- Chung, Y.R., Hoitink, H.A.J., 1990. Interactions between thermophilic fungi and *Trichoderma hamatum* in suppression of Rhizoctonia damping-off in a bark compostamended container medium. *Phytopathology* 80, 73–77.
- Cody, G.D., O'D Alexander, C.M., Tera, F., 2002. Solid-state (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C) nuclear magnetic resonance spectroscopy of insoluble organic residue in the Murchinson meteorite: A self-consistent quantitative analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, 1851–1865.
- Escudra, G.M.E., Amemiya, Y., 2008. Suppression of Fusarium wilt of spinach with compost amendments. *Journal of General Plant Pathology* 74, 267–274.
- Forste, C., Piazzini, A., Pizzanelli, S., Certini, G., 2006. CP MAS <sup>13</sup>C spectral editing and relative quantitation of a soil sample. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 30, 81–88.
- Garbeva, P., Postma, J., Veen, J.A., van Elsland, J.D., 2006. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. *Environmental Microbiology* 8, 233–246.
- Hammond, T.E., Cory, D.G., Ritchey, W.M., Morita, H., 1985. High resolution solid state <sup>13</sup>C NMR of Canadian peats. *Fuel* 64, 1687–1695.

- Handreck, K., Black, N., 1991. Growing Media for Ornamental Plants and Turf. New South Wales University Press, Kensington, Australia.
- Hatcher, P.G., Breger, I.A., Dennis, L.W., Maciel, G.E., 1983. Solid-state carbon-<sup>13</sup>-NMR of sedimentary humic substances: new revelations on their chemical composition. In: Christman, R.F., Gjessing, E.T. (Eds.), Aquatic and Terrestrial Humic Materials. Ann Arbor Science, Ann Arbor, pp. 37–81.
- Hoitink, H.A.J., Boehm, M.J., Hadar, Y., 1993. Mechanisms of suppression of soilborne plant pathogens in compost-amended substrates. In: Hoitink, H.A.J., Keener, H.M. (Eds.), Science and Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiological and Utilization Aspects. Renaissance Publications, Worthington, OH, pp. 601–621.
- Hoitink, H.A.J., Boehm, M.J., 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. Annual Review of Phytopathology 37, 427–446.
- Kepner Jr., R.L., Pratt, J.R., 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacterial in environmental samples: past and present. Microbiological Reviews 58, 603–615.
- Knicker, H., Almendros, G., González-Villa, F.J., González-Pérez, J.A., Polvillo, O., 2006. Characteristic alterations of quantity and quality of soil organic matter caused by forest fires in continental Mediterranean ecosystems: a solid-state <sup>13</sup>C NMR study. European Journal of Soil Science 57, 558–569.
- Komada, H., 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Review of Plant Protection Research 8, 114–125.
- Maciel, G.E., O'Donnell, D.J., Ackerman, J.J.H., Hawkins, B.H., Bartuska, V.J., 1981. A <sup>13</sup>C NMR study of four lignins in the solid and solution states. Makromolekulare Chemie 182, 2297–2304.
- Pane, C., Spaccini, R., Piccolo, A., Scala, F., Bonanomi, G., 2011. Compost amendments enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. Biological Control 56, 115–124.
- Preston, C.M., Axelson, D.E., Lévesque, M., Mathur, S.P., Diné, H., Dudley, R.L., 1989. Carbon-13 NMR and chemical characterization of particle-size separates of peats differing in degree of decomposition. Organic Geochemistry 14, 393–403.
- Sole-Mauri, F., Illa, J., Magrí, A., Prenafeta-Boldú, F.X., Flotats, X., 2007. An integrated biochemical and physical model for the composting process. Bioresource Technology 98, 3278–3293.
- Spaccini, R., Piccolo, A., 2008. Spectroscopic characterization of compost at different maturity stages. Clean 36, 152–157.
- Stone, A.G., Traina, S.J., Hoitink, H.A.J., 1997. Changes in mass and chemical composition of a composted dairy manure during decomposition to relationship to the collapse of suppression to *Pythium* root rot. Phytopathology 87, S94 (Abstr.).
- Suzuki, S., Rodríguez, B.E., Saito, K., Shintani, H., Iiyama, K., 1998. Compositional and structural characteristics of residual biomass from tropical plantations. Journal of Wood Science 44, 40–46.
- Tuiter, G., Szczech, M., Bollen, G.J., 1998. Suppression of *Rhizoctonia solani* in potting mixtures amended with compost made from organic household waste. Phytopathology 88, 764–773.
- Webster, E.A., Chudek, J.A., Hopkins, D.W., 1997. Carbon transformations during substrate utilization by the microbial community in an organic soil: a Solid-State NMR study. In: Insam, H., Rangger, A. (Eds.), Microbial Communities. Functional Versus Structural Approaches. Springer, Heidelberg, p. 242.

# CAPÍTULO 3

## *Selección de agentes de control biológico contra la Fusariosis vascular del tomate y evaluación en condiciones de invernadero de dos agentes seleccionados en tres medios de crecimiento*

### Abstract Gráfico





## SELECCIÓN DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO CONTRA LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL TOMATE Y EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE INVERNADERO DE DOS AGENTES SELECCIONADOS EN TRES MEDIOS DE CRECIMIENTO

### Resumen

---

Dos prácticas de control biológico son el uso de medios de crecimiento supresivos y la aplicación de agentes de control biológico (ACBs). Los objetivos de este estudio fueron: i) el estudio de 584 potenciales ACBs obtenidos de medios de crecimiento supresivos a Fusariosis vasculares (FV); ii) evaluar, en condiciones de invernadero, los ACBs seleccionados en tres medios de crecimiento vegetal con diferentes niveles de supresividad a la FV del tomate. Dos aislados seleccionados tras el screening fueron identificados como *Fusarium solani* (aislado 305) y *Streptomyces* sp. (aislado A19).

Los resultados mostraron que la FV se redujo y la producción total se mejoró cuando ambos aislados se aplicaron en un medio conductor a la FV (Fibra de Coco, FC). En un medio altamente supresivo (compost de orujo de vid, OV), los aislados 305 y A19 no mejoraron la supresividad. En el medio de crecimiento con supresividad moderada (compost de corcho, CC), sólo el aislado A19 mejoró la supresividad a niveles mostrados por el OV. Por lo tanto, la supresividad de los composts a la FV del tomate dependió de la naturaleza del compost y de los aislados aplicados.





# Selection of biological control agents against tomato *Fusarium* wilt and evaluation in greenhouse conditions of two selected agents in three growing media

R. Castaño · C. Borrero · M. I. Trillas ·  
M. Avilés

Received: 29 December 2011 / Accepted: 12 June 2012  
© International Organization for Biological Control (IOBC) 2012

**Abstract** Two biological control practices are the use of suppressive growing media and the application of biological control agents (BCAs). The goals of this study were: (i) to screen 584 potential BCAs obtained from *Fusarium* wilt (FW) suppressive growing media; (ii) to evaluate in greenhouse conditions selected BCAs in three growing media with different degrees of suppressiveness of tomato FW. Two isolates selected after screening were identified as *Fusarium solani* (305) and *Streptomyces* sp. (A19). Results showed that tomato FW was reduced and total production was improved when both BCAs were

applied to a conducive medium (coir fiber). In highly suppressive growing medium (grape marc compost), A19 and 305 inoculations did not improve suppressiveness. In moderately suppressive growing medium (cork compost), only A19 improved this compost to natural grape marc compost suppressiveness level. Therefore, compost suppressiveness of tomato FW depended on the nature of the compost and on the isolates applied.

**Keywords** Biocontrol · Suppressive growing media · *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* · *Fusarium solani* · *Streptomyces* sp.

---

Handling Editor: Monica Höfte

---

R. Castaño (✉) · M. Avilés  
Departamento de Ciencias Agroforestales,  
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica,  
University of Seville, Ctra. Utrera Km 1,  
41013 Seville, Spain  
e-mail: rcastano@us.es

M. Avilés  
e-mail: aviles@us.es

C. Borrero  
Biocontrol Technologies S. L., Parc Científic  
de Barcelona, C/ Baldiri Reixac, 15-21, 08028  
Barcelona, Spain

M. I. Trillas  
Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia,  
Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal 645,  
08028 Barcelona, Spain

## Introduction

Tomato fruit, obtained from *Solanum lycopersicum* L. plants, has become the most consumed food worldwide (Borrero et al. 2006). Spain is one of the five main tomato-producing countries in Europe. Its production in 2009 was about  $4604.8 \cdot 10^3$  tons, of which 41.3 % and 34.6 % were in Extremadura and Andalusia, respectively (Anonymous 2010). *Fusarium* wilt (FW) is one of the principal soilborne systemic diseases affecting tomato plants. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* W. C. Snyder & H. N. Hans (Fol) is the soilborne fungal plant pathogen responsible for this vascular wilt, which occurs throughout most tomato-growing areas and can devastate a crop (Larkin and Fravel 1998).

Management strategies are focused on preventive measures, including the use of resistant cultivars, effective soil fumigation treatments and biological control. Although the use of *Fusarium*-resistant tomato cultivars provides some degree of control, the occurrence and development of new pathogenic races is a problem (Larkin and Fravel 1998). In addition, the chemical control that is available for this disease is deficient, and there is concern over the rise of new fungicide-resistant pathogen species (Dekker 1981), the risk of non-target effects of pesticides and the damage caused to the environment. Therefore, there is an interest in technologies that reduce dependency on synthetic, chemical pesticides (Brimmer and Boland 2003). Biological control of plant diseases, using composts and biological control agents (BCAs), has received attention as an alternative to the intensive use of chemically synthesized products. This alternative is perceived to be safer and to have a minimal environmental impact (Brimmer and Boland 2003).

The capacity of certain composts to suppress plant diseases, minimize organic waste and reduce fertilizer and fungicide addition in crop production is widely known. Effectiveness of composts against plant diseases caused by a broad range of pathogens, including bacteria, fungi and nematode species, has been demonstrated in numerous studies (Litterick et al. 2004; Noble and Coventry 2005; Bonanomi et al. 2010; Avilés et al. 2011). Several composts have shown suppressiveness against tomato FW (Cotxarrera et al. 2002; Borrero et al. 2004, 2005, 2006; Castaño et al. 2011). Suppressiveness levels have been found to vary depending on the kind of compost used. For example, grape marc compost (GMC) and cork compost (CC) display high and moderate suppressive levels to tomato FW (Borrero et al. 2004, 2005, 2006), respectively, even when different batches are used (Castaño et al. 2011).

Another very common approach is the use of BCAs. These microorganisms are perceived to have advantages over synthetic fungicides, as they have fewer environmental negative effects, are effective against fungicide-resistant pathogens, reduce probability of resistance development and can be used in organic farming, where use of synthetic fungicides is restricted (Brimmer and Boland 2003). However, only a few BCAs are available on the European market. Some of these are selected from suppressive soils or growing

media for their efficacy in controlling diseases and developing a biological control product (Nelson et al. 1983; Alabouvette et al. 2006). Rhizosphere microbes may exert specific plant growth promotion or biocontrol effects, which could be of great advantage to the selection of possible BCAs (Hartman et al. 2009). Effective fungi (Punja and Utkhede 2003), bacteria and actinomycetes (de Boer et al. 2003; El-Tarabily and Sivasithamparam 2006) have been used as BCAs against plant diseases. Compost manufacturers should evaluate the economic viability of each compost in relation to addition of a BCA (Trillas et al. 2006).

The goals of this study were: (i) selection of potential BCAs against tomato FW isolated from suppressive growing media, (ii) evaluation in greenhouse conditions of the selected BCAs in combination with conducive coir fiber (CF) and two composts with different degrees of natural suppression of FW: highly suppressive GMC and moderately suppressive CC (Borrero et al. 2004, 2006; Castaño et al. 2011).

## Materials and methods

### Selection of possible BCAs from growing media formulated with composts

To obtain potential BCAs, growing media made from composts of agricultural industry waste were assayed for suppressiveness against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) and *dianthi* (FOD) in tomato and carnation, respectively. The composts used, derived from turned piles, are described elsewhere (Trillas et al. 2002; Carmona et al. 2004). These growing media were: (1) GMC from the alcohol distilling industry (grape skins, seeds and stems), (2) CC from cork (*Quercus suber* L.) transformation, (3) olive oil husk + cotton gin trash, 1:1 v/v, composted and mixed with rice husk (1:1 v/v) (OC + R) and (4) spent mushroom compost (Recomsa, Quintanar del Rey, Spain) mixed with amended light peat (Klasmann, Valimex, Palleter, Spain) (1:1 v/v) (SM + P). These composts were not phytotoxic when used as growing media for tomato or carnation plants. At the end of these assays, 584 microorganisms were isolated from *Fusarium*-infested rhizospheres of healthy plants.

Microorganisms were isolated by dilution plating of aqueous extractions of rhizospheres on different

semi-selective culture media, according to Tuitert et al. (1998) with modifications (Borrero et al. 2005). In culture media for isolation of *Bacillus* spp. (nutrient agar), fluorescent *Pseudomonas* spp. (King B), oligotrophic (nutrient agar 0.01) and cellulolytic (cellulose agar) bacteria and actinomycetes, 100 µg ml<sup>-1</sup> of cycloheximide was substituted for 10 µg ml<sup>-1</sup> of benomyl (Energía e Industrias Aragonesas, S.A., Madrid) and 0.3 µl ml<sup>-1</sup> of Previcur (propamocarb, 72.2 %, Schering, Alcácer, Spain). Fungi were isolated on potato dextrose agar amended with 1,000 ppm of Tergitol-7 (Fluka Chemie AGB, Buchs, Switzerland) and 50 µg ml<sup>-1</sup> of oxytetracycline hydrochloride (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) (Chen et al. 1988). *Fusarium* spp. were isolated on Komada's medium (Komada 1975) and *Talaromyces* spp. and *Trichoderma* spp. were isolated on semi-selective media (Chung and Hoitink 1990; Dhingra and Sinclair 1995).

The disease-suppression effects of these isolates were measured with two kinds of efficacy assays against FW using tomato plants cultured in CF (Cocopeat, Projar, Valencia, Spain). These assays had randomized three-block designs. In the first kind of assay, isolates were inoculated in groups of four. In the second kind of assay, isolates previously tested in groups of four, which significantly reduced the disease severity compared to FOL-infested treatment alone, were tested individually. All isolates (584) were evaluated with the first assay and 112 isolates were evaluated with the second kind of assay. For these assays, each pot (330 ml) had four tomato seedlings. Plants were grown in a growth chamber (25 °C, 16:8 h light:dark photoperiod and 27 °C). Plants were irrigated as needed and fertilized with a nutrient solution containing: 0.5 g l<sup>-1</sup> Peter's foliar feed (27 + 15 + 12; N + P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + K<sub>2</sub>O; and micronutrients; Scotts, Heerlen, The Netherlands), 0.6 g l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.7 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 0.3 g l<sup>-1</sup> urea (pH 6.1).

Bacterial and actinomycete isolates were grown on tryptic soy agar (50 %) and were inoculated at ~10<sup>6</sup> bacteria cm<sup>-3</sup> substrate. Fungal isolates were grown on malt agar and were inoculated at 10<sup>5</sup> conidia cm<sup>-3</sup> substrate. Inocula were quantified with aid of a haemocytometer (counting chamber depth: 0.1 mm for fungi and 0.02 mm for bacteria and actinomycete isolates). These inoculations were performed five days after sowing.

FOL (isolate FN2) was grown for seven days in AMAP culture media containing 10 g l<sup>-1</sup> agar, 10 g l<sup>-1</sup> malt extract (Difco, Le Pont de Claix, France), 2 g l<sup>-1</sup> asparagine (Difco, Le Pont de Claix, France) and 0.5 g l<sup>-1</sup> Peter's foliar feed. Five ml of sterile distilled water (SDW) were added to each culture plate. The surface of the culture was scraped with a sterile spreader. The concentration of conidia was determined with aid of a haemocytometer. CF was infested with FN2 (4 · 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> conidia cm<sup>-3</sup> growing medium) 4–5 days after potential BCAs inoculation. Pots of growth medium without FN2 were prepared to assess adequate agronomic conditions in the assays.

Disease severity was monitored at 2–3 day intervals and was scored based on a symptom severity scale (Borrero et al. 2004). In each disease assessment, the mean of disease severity per pot was calculated. The area under the disease progress curve standardized (AUDPCs) per pot was calculated by disease severity integrated between the onset of symptoms and assay completion and by dividing by the total duration (days) of the epidemic in each assay, in order to compare the various assays, which had a variety of epidemic durations (Campbell and Madden 1990). Therefore, AUDPCs data can range from 0 to 1.

#### Identification of the selected isolates by DNA sequencing

After selection assays two isolates were chosen for their severity reduction (see “Results”). To identify them total genomic DNA from two isolates selected, A19 (cellulolytic actinomycete) and 305 (*Fusarium*-like fungus by microscope-observed morphology), was extracted from lyophilized cultures according to Cassago et al. (2002) with minor modifications.

Total DNA from isolate 305 was used for polymerase chain reaction (PCR) using the EF1 (5'-ATG GGTAAGGAGGACAAGAC-3') and EF2 (5'-GGAA GTACCAGTGATCATGTT-3') primers to amplify a portion of the Translation Elongation Factor 1- $\alpha$  gene (*TEF-1 $\alpha$* ). These primers amplified a highly informative region for differentiating *Fusarium* spp. and many *formae speciales* within the *F. oxysporum* complex (Geiser et al. 2004). Total DNA from A19 was used for PCR with the 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3') and 1389r (5'-ACGGGCGGTGTGTACAA G-3') primers to amplify a region of bacterial 16S rDNA (LaMontagne et al. 2003).

Genomic DNA was amplified in a solution containing Biotools Reaction Buffer  $1 \times (10 \times)$ , 3.75 mM  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 100  $\mu\text{M}$  of each dNTP (10 mM), 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer and 1 U of Biotools Pfu DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain) in a final volume of 50  $\mu\text{l}$ . The PCR cycling conditions consisted of an initial denaturation at 95 °C for 2 min, a first phase of ten cycles with an elongation phase at 72 °C for 2 min, and a second phase of 20 cycles, in which the elongation phase was increased by 4 s per cycle, starting from 2 min and maintaining the elongation temperature at 72 °C. During both phases of the PCR, elongation steps were preceded by a denaturation step (94 °C for 1 min) and an annealing step (54 °C for 30 s). Amplification was finished after a final extension phase for 5 min at 72 °C. PCR amplifications were performed on a GenAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, California, USA). Negative and positive controls were included in all experiments.

The PCR products were purified using Speedtools PCR Clean-up kit (Biotools, Madrid, Spain). Sequencing was performed by Secugen Sequencing Service Enterprises (Secugen, Madrid, Spain). Sequences were edited and then queried for similarity using NCBI GenBank database with the BLASTn alignment software tool for both isolates. Sequence homology identity was determined using the FASTA algorithm, in which the reference sequences most closely related to our sequences were found. The FUSARIUM-ID database (Geiser et al. 2004) was also used to confirm 305 sequence homology identity.

#### Preparation and quantification of pathogen and selected isolate inocula

Pathogen inoculation was performed with a monospore isolate of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 (isolate FN2). The pathogenicity of this isolate was confirmed in previous studies (Borrero et al. 2006; Castaño et al. 2011). It was recovered from stored inoculum (silica gel 4 °C) and grown in malt broth (10 g l<sup>-1</sup>) in a 10 l fermenter Biostat B (Braun Biotech-Sartorius, Aubagne, France). Isolate 305 was grown for seven days in AMAP culture media. Five ml of SDW was added to each culture plate. Plate surfaces were scraped with a sterile spreader. Concentrations of microconidia from isolate 305 and FN2 were determined with haemocytometer.

Isolate A19 was prepared from stored inoculum at -80 °C (Vibakstore Nirco, Barberà del Vallès, Barcelona, Spain). Stored microorganisms were grown in 2–3 plates with agar cellulose (AC) medium (Borrero et al. 2005) for seven days. Five ml of SDW were added to each culture plate and were placed in a sterile empty bottle. This suspension was raised to 50–80 ml using SDW. Then, 0.1 ml of this suspension was poured onto each AC culture plate (600–650) and their surfaces were scraped. Plates were grown at 25 °C in the dark. After 2–3 weeks, 5 ml of SDW were added to each culture plate and the surface was scraped. Suspension was sonicated for 30 min to avoid cellular aggregation. Concentration of A19 was determined by acridine orange direct counting (AODC) technique, which was performed by counting an A19 concentrated solution with an epifluorescence microscope (Kepner and Pratt 1994; Borrero et al. 2004). Three samples were analysed. Controls were also counted in sterile water.

#### Evaluation of suppressiveness of FW assays in greenhouse conditions

Two composts (GMC and CC) were evaluated in a tomato FW suppressiveness assay under greenhouse conditions. Composts were compared with CF. Physicochemical and biological properties of these growing media were evaluated in previous studies (Borrero et al. 2009; Castaño et al. 2011).

The assay was conducted in a greenhouse in Seville (Spain) at the beginning of 2008, with the susceptible tomato cultivar *Roma*. Tomato seeds were sown in peat and grown in a growth chamber (27 °C, photosynthetically active radiation intensity of 280  $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$  with a 16:8 h light:dark photoperiod). Plants were irrigated as needed and fertilized with 0.25 g l<sup>-1</sup> Peter's Foliar Feed, 0.15 g l<sup>-1</sup> KCl and 0.6 g l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>. After 20 days, three plantlets (2–3 true-leaf stage) were placed in bags (1 m × 25 cm) with 30 l of growing medium. Each experimental unit consisted of two bags. The experimental design involved three blocks × three growing media × two inoculated with pathogen and non-inoculated × three inoculated with 305, A19 or not inoculated leading to 54 experimental units. The assays were performed in a randomized complete-block design with three replicates and repeated twice.

At the beginning of the assay, plantlets were previously inoculated by root-dipping for 12 h using an inoculum suspension containing  $10^3$  microconidia (305) or cells (A19)  $\text{ml}^{-1}$ . The inoculation dose in bag was  $5 \cdot 10^3$  microconidia  $\text{cm}^{-3}$  and  $10^5$  cells  $\text{cm}^{-3}$  of growing media for 305 and A19, respectively. Inoculations were carried out on the same day of transplanting and were repeated at seven, 41 and 76 days after transplanting with the same doses. Pathogen inoculation was done two weeks after transplanting at  $5 \cdot 10^3$  conidia  $\text{cm}^{-3}$  growing medium. A second pathogen inoculation was carried out after 70 days using  $5 \cdot 10^4$  conidia  $\text{cm}^{-3}$  of growing media. Inoculum suspensions were applied by irrigating growing media with the help of syringes through dripper holes. Controls were irrigated with water.

During the assay, the fertirrigated nutrient solutions and the scale used to score disease severity in tomato plants were as described by Castaño et al. (2011). Disease severity was monitored twice a week. At each assessment, mean disease severity per experimental unit was calculated. The AUDPCs per experimental unit was calculated as previously. Duration of each assay was three months. Total production was scored as kg of tomato fruit harvested from each treatment during assays.

#### Quantification of *Fusarium* spp. and cellulolytic actinomycete populations in growing media

Population densities were determined by dilution plating on two semi-selective media using Komada's medium for *Fusarium* spp. populations and AC medium for cellulolytic microbial populations. Samples were taken from growing media at the beginning and end of the assays. Growing media (5–10 g) were taken and mixed from two bags (an experimental unit) and suspended in 90 ml of  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$   $1 \text{ g l}^{-1}$ . The suspension was shaken and a tenfold dilution series was prepared with 0.1 % water agar (w/v). Suspensions were pipetted onto three plates per dilution. Four–five dilutions per series were placed on plates. Colony-forming units (CFU) were counted four days after plating and expressed as  $\text{CFU cm}^{-3}$  of growing media.

Isolate 305 and pathogen FN2 quantification were developed at the end of the assays in growing media, in which both microorganisms were inoculated, using Komada's dilution plates. They were differentiated on

the basis of colony characteristics and morphological differences under the microscope.

#### Statistical analysis

Disease severity from selection assays (AUDPCs) was analysed with one-way ANOVA. Disease severity (AUDPCs) in greenhouse conditions was analysed with two-ways ANOVA. Terms included in this model were: (A factor) growing media inoculated with pathogen  $\times$  inoculated and non-inoculated with isolate 305 or A19 (6 levels), (B factor) blocks (three levels) and their interaction. Data from two assays were pooled for final analysis after finding no significant A factor  $\times$  assay interaction in a preliminary analysis of variance. Significant means were compared by LSD test ( $P < 0.05$ ). Data collected from populations (expressed as  $\text{CFU cm}^{-3}$  of growing media infested with FN2 per treatment at the beginning and the end of assay,  $n = 6$ ) and total production (expressed as kg per treatment in growing media infested or non-infested with FN2 during assay,  $n = 6$ ) were also analysed by two-way ANOVA. Data from populations and total production were pooled for final analysis after finding no significant A factor  $\times$  assay interaction in a preliminary analysis of variance. All analyses were made with Statgraphics Plus (version 5.1; Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA, 2002).

## Results

### Selection of possible BCAs from growing media formulated with composts and identification

Of all the isolates (584), isolates A19 (cellulolytic actinomycete) from CC and 305 (*Fusarium* spp.) from GMC showed excellent results, reducing disease severity in CF. Isolate A19 reduced AUDPCs by 95.6 % compared with controls, and isolate 305 by 96.6 %. Therefore, they were selected for further evaluation in efficacy assays in greenhouses.

Both strains showed strong sequence identity to known sequences. Isolate 305 showed a single mismatch with *F. solani* (99 %, FN689821.1) and isolate A19 showed a high identity with *Streptomyces* sp. (98 %, GU991351.1). Accession numbers are shown in Table 1.

**Table 1** Characteristics of potential BCAs

Strain <sup>a</sup>	Plant growth media origin <sup>b</sup>	Rhizosphere <sup>c</sup>	Genus/species <sup>d</sup>	Accession number/reference <sup>e</sup>
305	GMC	Carnation	<i>F. solani</i>	JF923745
A19	CC	Tomato	<i>Streptomyces</i> sp.	JF923746

<sup>a</sup> Putative BCAs

<sup>b</sup> Composts from which isolates were obtained. GMC grape marc compost, CC cork compost

<sup>c</sup> Plant rhizosphere from which isolates were isolated

<sup>d</sup> Most probable genus/species using NCBI BLAST Tool

<sup>e</sup> Accession number using *TEF1- $\alpha$*  gene and 16s rDNA sequences for isolates 305 and A19, respectively

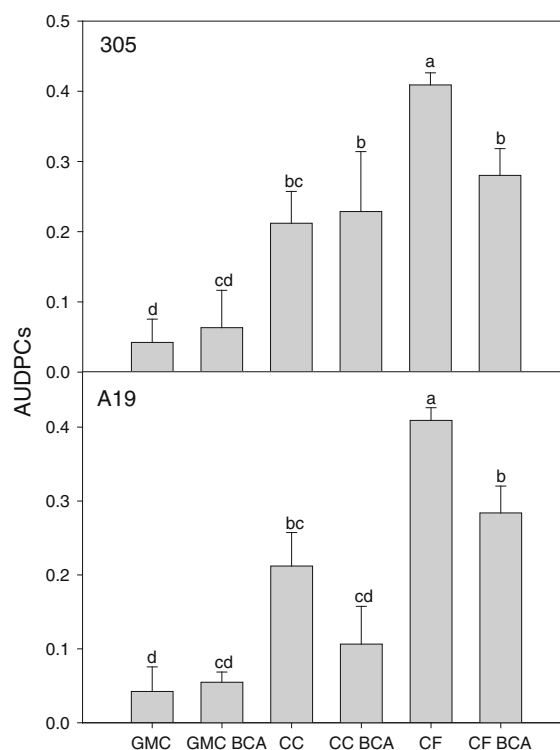
### Effects of growing media and selected isolates on suppressiveness to tomato FW in greenhouse conditions

The onset of symptoms in CF appeared ~ ten days earlier than in GMC. The AUDPCs at the end of assays indicated that the two composts had significant suppressive effects on FW in comparison with CF, which showed the highest values of severity (Fig. 1). This disease was suppressed most effectively in GMC, followed by CC.

No effects were observed on AUDPCs when isolates 305 and A19 were added to composts, not improving their naturally suppressive effect (Fig. 1). Moreover, CC inoculated with A19 obtained similar suppressiveness to natural GMC. However, isolates significantly reduced disease severity in CF (Fig. 1). This severity reduction was equivalent to that observed in naturally suppressive CC. None of the plants grown in the three non-infested control growth media inoculated or not with the BCAs showed signs of weaknesses or toxicity during cultivation and none developed symptoms of tomato FW.

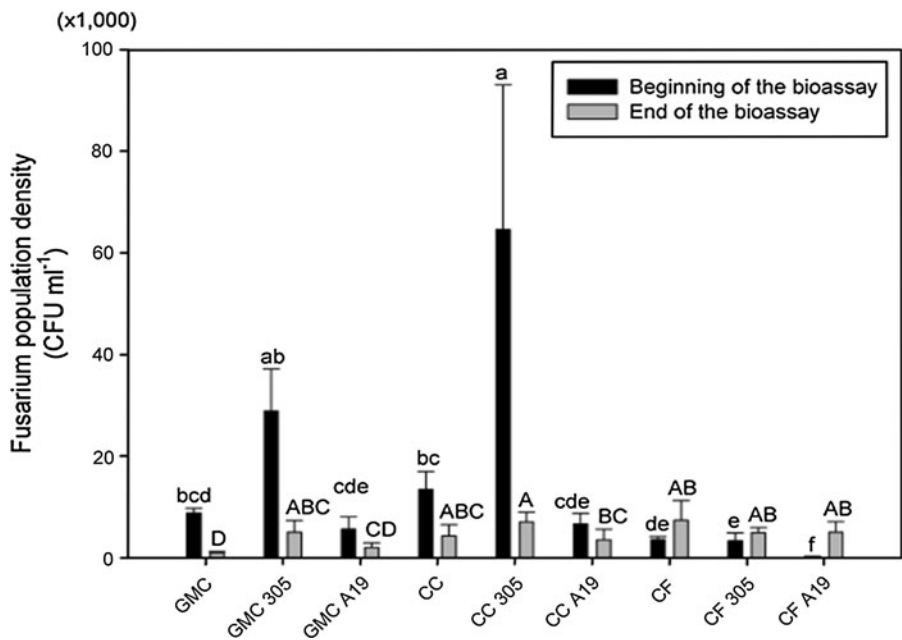
### *Fusarium* spp. population densities at the beginning and end of assays

At the beginning of assays, 305 and A19 behaved differently, depending on the growing media in which they were inoculated. Only *Fusarium* spp. density increased when 305 was inoculated in CC (Fig. 2). At the end of assays, *Fusarium* population density showed differences only when isolate 305 was applied to GMC, in comparison to GMC without 305 (Fig. 2). However, isolate 305 population was not statistically



**Fig. 1** Standardized areas under disease progress curve (AUDPCs) for tomato plants cultured in three growing media (GMC grape marc compost, CC cork compost, CF coir fiber) inoculated or not with isolate 305 or A19. All these treatments were artificially infested with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 (FN2). Bars with the same letters were not significantly different ( $P \leq 0.05$ ) according to LSD test ( $F_{5,18} = 11.10$  and  $14.16$  and  $P = 0.0001$  and  $<0.0001$  for AUDPCs in 305 and A19 respectively). Analysis of variance was performed with arcsine ( $\sqrt{x}$ ) transformed data. Error bars represent SE ( $n = 6$ )

different from pathogen in GMC 305 when both microorganisms were scored (Table 2), and CC 305 and CF 305 growing media showed higher isolate 305



**Fig. 2** *Fusarium* spp. population densities at the beginning and end of assays. Growing media were infested with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 (FN2). GMC grape marc compost, CC cork compost, CF coir fiber; 305: inoculated with 305 isolate; A19: inoculated with A19 isolate. Bars with the same lower-case letter for the beginning of bioassays or upper-case letter for the

end of bioassays were not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to LSD test ( $F_{8,27} = 40.7$  and  $4.25$  and  $P < 0.0001$  and  $P = 0.0021$  for *Fusarium* population densities at the beginning and the end of bioassays respectively). Analysis of variance was performed with transformed data as  $\ln(x + 0.083)$ . Error bars represent SE ( $n = 6$ )

**Table 2** CFU cm<sup>-3</sup> of growing medium from total *Fusarium* spp., isolates 305 and FN2 at the end of assays in treatments in which strain 305 and FN2 were inoculated

CFU cm <sup>-3</sup>	Growing media		
	GMC 305	CC 305	CF 305
Total	4,704 (2,385)	7,396 (1,973)	4,559 (1,043)
305	3,691 (1,872)a	6,651 (1,711)a	3,163 (1,052)a
FN2	1,006 (531)a	401 (227)b	832 (174)b

Within each column, values with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to LSD test ( $F_{1,6} = 5.96, 7.42$  and  $49.60$  and  $P = 0.0504, 0.0345$  and  $0.0004$  for populations in GMC 305, CC 305 and CF 305 respectively). Analysis of variance was performed with transformed data as  $\ln(x + 0.083)$ . SE are indicated in brackets ( $n = 6$ )

GMC 305 grape marc compost, CC 305 cork compost, CF 305 coir fiber, CFU colony forming units cm<sup>-3</sup> of growing media, Total total *Fusarium* spp. population density, 305 isolate 305, FN2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2

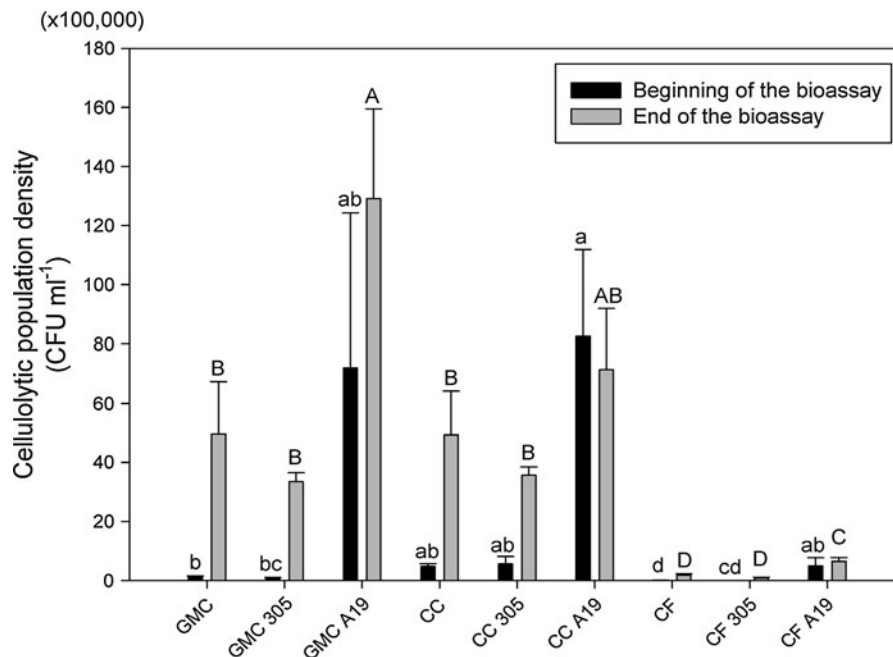
population than pathogen (Table 2). However, differences in suppressiveness were only achieved in CF 305 (Fig. 1).

### Cellulolytic population densities at the beginning and end of assays

At the beginning of assays, cellulolytic populations were higher than in the control in inoculated CF (CF A19) (Fig. 3). At the end of assays, cellulolytic population densities were higher in GMC A19 and CF A19 than in GMC and CF, respectively. Differences in suppressiveness were only achieved in CF A19 (Fig. 1). However, no significant differences were observed in CC (Fig. 3).

### Tomato production at the end of assays

Using the same fertirrigation in all growing media, A19 improved total tomato production over the natural growing medium in two situations: for CC in treatments not inoculated with the pathogen and in CF in treatments inoculated with the pathogen (Table 3). Isolate 305 did not improve or worsen total production in relation to natural growing media.



**Fig. 3** Cellulolytic population densities at the beginning and end of assays. Growing media were infested with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 (FN2). GMC grape marc compost, CC cork compost, CF coir fiber; 305 inoculated with 305 isolate; A19 inoculated with A19 isolate. Bars with the same lower-case letter for the beginning of bioassays or upper-case letter for the

end of bioassays were not significantly different ( $P < 0.05$ ) according to LSD test ( $F_{8,27} = 37.85$  and  $67.51$  and  $P < 0.0001$  and  $P < 0.0001$  for cellulolytic population densities at the beginning and the end of bioassays respectively). Analysis of variance was performed with transformed data as  $\ln(x + 0.083)$ . Error bars represent SE ( $n = 6$ )

## Discussion

The rhizodeposition of plants influences the surrounding soil and its microflora (Garbeva et al. 2011). Root exudates have selective and promoting effects on specific microbial populations, which are able to respond to chemotaxis and fast growth responses, but only a small part of the whole soil's microbial diversity finally colonizes roots successfully (Hartman et al. 2009). If these microorganisms are obtained from healthy rhizospheres, they can probably collaborate in plant health, especially when the rhizosphere has high doses of a pathogen (Zheng et al. 2011). In this screening, we used selective culture media for some genera that are commonly involved in biocontrol (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Fusarium*, *Talaromyces* and *Trichoderma*). Additional culture media were used to obtain strains of other genera involved in suppressiveness that reflect the suppressive microbial diversity in the BCAs collection. After microorganism isolation, some authors screen microorganism collections with some

biological and biochemical proofs such as antimicrobial compound production, mycoparasitism detection, siderophore production, enzyme activities related to biocontrol evaluation, etc. (Tondje et al. 2007; Roy et al. 2009; Paternoster et al. 2010; Taurian et al. 2010). In this study the selection criterion chosen was BCA efficacy against tomato FW, regardless of the mechanism of action.

The composts studied were evaluated in suppressiveness assays as in previous studies (Borrero et al. 2004, 2005, 2006, 2009; Trillas et al. 2006; Castaño et al. 2011), in which the authors discussed whether biocontrol mechanisms associated with natural suppression of composts may be associated partially with microbiostasis (Borrero et al. 2009). The high microbial diversity of these composts may favour a competitive state affecting pathogen and both isolates 305 and A19. This could explain why the application of isolates 305 and A19 to these composts, particularly GMC, did not lead to any significant advantage.

The highest disease suppression shown for natural GMC was difficult to improve with addition of one



**Table 3** Total tomato production (kg) at the end of assays

Treatment	FN2	
	–	+
GMC	500.69 (41.45)a	410.90 (110.84)a
GMC 305	410.46 (20.22)a	332.14 (71.42)a
GMC A19	450.16 (56.79)a	459.02 (81.72)a
CC	409.12 (20.83)b	538.95 (10.09)a
CC 305	439.87 (42.36)ab	401.77 (65.67)a
CC A19	548.53 (43.14)a	424.74 (40.59)a
CF	446.09 (83.39)a	464.20 (67.86)b
CF 305	522.64 (77.73)a	486.49 (75.30)ab
CF A19	610.84 (34.89)a	569.10 (103.23)a

Treatments with (+) or without (–) pathogen. Different letters in each column and for each growing medium indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) according to LSD test ( $F_{2,9} = 0.74, 4.60, 3.29, 1.48, 2.29$  and  $4.44$  and  $P = 0.5060, 0.0420, 0.0844, 0.2771, 0.1576$  and  $0.0455$  for production in GMC, CC and CF without pathogen and GMC, CC and CF with pathogen respectively). Analysis of variance was performed with transformed data as  $\ln(x)$ . SE are indicated in brackets ( $n = 6$ )

GMC grape marc compost, CC cork compost, CF coir fiber, 305 inoculated with 305 isolate, A19 inoculated with A19 isolate. FN2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2

isolate. In this sense, the BCA *Trichoderma asperellum* T34 reduced 30 % of carnation FW severity in a moderately suppressive GMC formulated with peat (1:1 v:v) (Sant et al. 2010). In the present study CC (moderately suppressive compost) reached the same level of suppressiveness as GMC (highly suppressive compost) with A19. However, isolate T34 could not improve highly suppressive compost's efficacy (Trillas et al. 2006), which was similar to results of isolates 305 and A19 for highly suppressive GMC. Therefore, this study suggests that it is difficult to improve with any BCA tomato FW control composts with the natural suppressiveness level of GMC.

A study by Larkin and Fravel (1998) reported that ranges of tomato FW reduction by BCAs in tomato plants were generally between 30–65 % and 40–66 % in cases of suppressive bacteria and fungi, respectively. Starting from 584 isolates obtained from suppressive rhizospheres, we found two potential BCAs, a strain of *F. solani* (isolate 305) and a *Streptomyces* sp. (isolate A19). Tomato FW severity was clearly reduced in CF by 305 and A19, providing the same level of suppression as the moderately

suppressive CC. This conducive growing medium (CF) is employed worldwide, due to its good physical properties (Abad et al. 2002).

In agreement with this present study, the control of FW diseases by non-pathogenic *Fusarium* spp. has been demonstrated in several studies (Larkin and Fravel 1998, 1999, 2002; Weller et al. 2002; Alabouvette et al. 2009; Zheng et al. 2011). However, there are few reports on biocontrol by non-pathogenic *Fusarium* spp. belonging to species other than *F. oxysporum*. Two non-pathogenic *F. solani* (strains CS-1 and CS-6) were shown as BCAs for *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, against *niveum* in watermelon, *melonis* in melon (Larkin and Fravel 1998) and *basilici* in basil (Larkin and Fravel 1999).

The best-documented biocontrol mechanisms between pathogenic and non-pathogenic *F. oxysporum* concern competition for nutrients, mainly carbon sources, and induced systemic resistance (ISR) (Larkin and Fravel 1999; Alabouvette et al. 2006). Therefore, a possible competition mechanism could be related to isolate 305 due to its higher population density in CF at the end of the assay in comparison with FN2. In contrast, strain CS-1 previously demonstrated evidence of ISR as a mechanism of biocontrol in watermelon and tomato (Larkin and Fravel 1998). Both action mechanisms confirm previous studies, in which two non-pathogenic *F. oxysporum* CS-20 and Fo47 have different control mechanisms against FWs (Larkin and Fravel 1998, 1999). In future studies, ISR action of isolate 305 could be evaluated.

Other studies using strains of actinomycetes such as BCA have been carried out with members of the genus *Streptomyces* (Doubou et al. 2002; Coombs et al. 2004; Kim and Hwang 2007; Quecine et al. 2008). Furthermore, there are several examples using *Streptomyces* as BCAs against many plant diseases, such as *Phytophthora* root rot in alfalfa and soybean (Xia et al. 2002), FW in cucumber (Singh et al. 1999), drop disease caused by *Sclerotinia minor* in lettuce (El-Tarabily et al. 2000) and blast and sheath blight in rice (Prabavathy et al. 2006). Indeed, other non-streptomyces actinomycetes have been reported as potential BCAs (El-Tarabily and Sivasithamparam 2006).

Isolates 305 and A19 developed better in growing media from which they were not isolated. Severity in CC was reduced when isolate A19 was added, although there was no significant difference with natural CC. However, CC A19 showed similar

suppressiveness to GMC. Possibly strain A19 (a cellulolytic actinomycete) in CC might improve severity reduction at an effective dose, because it is the origin of the growing medium CC, which liberates cellulose slowly (Trillas et al. 2006). Several studies reported the importance of dose application in relation with the mode of action of the BCAs (Larkin and Fravel 1998, 1999; Mandeel and Baker 1991; Alabouvette et al. 2006).

Disease reduction in CF due to A19 and 305 treatments increased total production but only A19 had significant production augment. Without pathogen the production increase in CC could indicate a plant-growth promoting effect. In this sense, some authors report that actinomycetes have a growth-promoting effect (Doubou et al. 2002; El-Tarabily and Sivasi-thamparam 2006).

In conclusion, in highly suppressive growing medium (GMC), *Streptomyces* spp. (strain A19) and *F. solani* (strain 305) introduction did not improve suppressiveness. In moderately suppressive growing medium (CC), only A19 improved this compost to GMC suppressiveness level. In the conducive growing medium (CF), that is used worldwide, both isolates improved suppressiveness to the same level as CC.

**Acknowledgments** This research was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2005-08137-C03-02), Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (P06-AGR-02313) and Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2008-05414-C03-01) of Spain. We thank M.L. Castillo, S. Castillo and J. Rojo for their excellent technical assistance.

## References

- Abad M, Noguera P, Puchades R, Maquieira A, Noguera V (2002) Physico-chemical and chemical properties of some coconut coir dust for use as a peat substitute for containerised ornamental plants. *Bioresour Technol* 82:241–245
- Alabouvette C, Olivain C, Steinberg C (2006) Biological control of plant diseases: the European situation. *Eur J Plant Pathol* 114:329–341
- Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, Steinberg C (2009) Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytol* 184:529–544
- Anonymous (2010) Avances de superficies y producciones agrícolas. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Spain, p 28
- Avilés M, Borrero C, Trillas MI (2011) Review on compost as an inducer of disease suppression in plants grown in soilless culture. In: Special Issue Compost III—dynamic plant, dynamic soil. Global Science Books. 5 (Special Issue 2), pp 1–11
- Bonanomi G, Antignani V, Capodilupo M, Scala F (2010) Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biol Biochem* 42:136–144
- Borrero C, Trillas MI, Ordovás J, Tello JC, Avilés M (2004) Predictive factors for the suppression of *Fusarium* wilt of tomato in plant growth media. *Phytopathology* 94:1094–1101
- Borrero C, Infantes MJ, González E, Tello JC, Avilés M (2005) Relation between suppressiveness to tomato *Fusarium* wilt and microbial populations in different growth media. *Acta Hort* 697:425–430
- Borrero C, Ordovás J, Trillas MI, Avilés M (2006) Tomato *Fusarium* wilt suppressiveness. The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities as characterised by Biolog®. *Soil Biol Biochem* 38:1631–1637
- Borrero C, Trillas MI, Avilés M (2009) Carnation *Fusarium* wilt suppression in four composts. *Eur J Plant Pathol* 123:425–433
- Brimmer T, Boland G (2003) A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agric Ecosyst Environ* 100:3–16
- Campbell CL, Madden LV (1990) Introduction to plant disease epidemiology. Wiley, New York, USA
- Carmona E, Avilés M, Domínguez I, Moreno MT, Pajuelo P, Ordovás J (2004) Exploitation of composted agricultural wastes as growing media. In: Bernal MP, Moral R, Clemente R, Paredes C (ed) Sustainable organic waste management for environmental protection and food safety, vol I. Ramiran 2004. Proceedings of the 11th international conference of the FAO SCORENA network on the recycling of agricultural residues in agriculture, Murcia, Spain, pp 141–144
- Cassago A, Panepucci RA, Tordella-Baião AM, Henrique-Silva F (2002) Cellophane based mini-prep method for DNA extraction from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *BMC Microbiol* 2:14–17
- Castaño R, Borrero C, Avilés M (2011) Organic matter fractions by SP-MAS 13C NMR and microbial communities involved in the suppression of *Fusarium* wilt in organic growth media. *Biol Control* 58:286–293
- Chen W, Hoitink HAJ, Schmitthenner AF, Tuovinen OH (1988) The role of microbial activity in suppression of damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 78:314–322
- Chung YR, Hoitink HAJ (1990) Interactions between thermophilic fungi and *Trichoderma hamatum* in suppression of Rhizoctonia damping-off in a bark compost-amended container medium. *Phytopathology* 80:73–77
- Coombs JT, Michelsen PP, Franco MM (2004) Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biol Control* 29:359–366
- Cotxarrera L, Trillas-Gay MI, Steinberg C, Alabouvette C (2002) Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biol Biochem* 34:467–476

- De Boer W, Verheggen P, Klein Gunnewiek PJA, Kowalchuk GA, van Veen JA (2003) Microbial community composition affects soil fungistasis. *Appl Environ Microbiol* 69:835–844
- Dekker J (1981) Resistance to fungicides in plant pathogens: abstracts of papers. *Neth J Plant Pathol* 87:233–255
- Dhingra O, Sinclair J (1995) Basic plant pathology methods, 2nd edn. Lewis Publisher, Boca Raton, USA
- Doumbou CL, Hamby Salove MK, Crawford DL, Beaulieu C (2002) Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82:85–102
- El-Tarabily KA, Sivasithamparam K (2006) Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biol Biochem* 38:1505–1520
- El-Tarabily KA, Soliman MH, Nassar AH, Al-Hassani HA, Sivasithamparam K, McKenna F, Hardy GESJ (2000) Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathol* 49:573–583
- Garbeva P, Gera Hol WH, Termorshuizen AJ, Kowalchuk GA, de Boer W (2011) Fungistasis and general soil biostasis—a new synthesis. *Soil Biol Biochem* 43:469–477
- Geiser DM, Jiménez-Gasco MM, Kang S, Makalowska I, Veeraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K (2004) Fusarium-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol* 110:473–479
- Hartman A, Schmid M, van Tuinen D, Berg G (2009) Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321:235–257
- Kepner JR, Pratt JR (1994) Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacterial in environmental samples: past and present. *Microbiol Mol Biol Rev* 58:603–615
- Kim BS, Hwang B (2007) Microbial fungicides in the control of plant diseases. *J Phytopathol* 155:641–653
- Komada H (1975) Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev Plant Prot Res* 8:114–125
- LaMontagne MG, Schimel JP, Holden PA (2003) Comparison of subsurface and surface soil bacterial communities in California grassland as assessed by terminal restriction fragment length polymorphisms of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Microb Ecol* 46:216–227
- Larkin RP, Fravel DR (1998) Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Dis* 82:1022–1028
- Larkin RP, Fravel DR (1999) Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* 89:1152–1161
- Larkin RP, Fravel DR (2002) Effects of varying environmental conditions on biological control of *Fusarium* wilt of tomato nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* 92:1160–1166
- Litterick AM, Harrier L, Wallace P, Watson CA, Wood M (2004) The role of uncomposted materials, composts, manures, and composts extracts in reducing pest and disease incidence and severity in sustainable temperate agricultural and horticultural crop production—a review. *Crit Rev Plant Sci* 23:453–479
- Mandel Q, Baker R (1991) Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81:462–469
- Nelson EB, Kuter GA, Hoitink HAJ (1983) Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology* 73:1457–1462
- Noble R, Coventry E (2005) Suppression of soil-borne plant diseases with composts: a review. *Biocontrol Sci Technol* 15:3–20
- Paternoster T, Défago G, Duffy B, Gessler C, Pertot I (2010) Selection of a biocontrol agent based on a potential mechanism of action: degradation of nicotinic acid, a growth factor essential for *Erwinia amylovora*. *Int Microbiol* 13:195–206
- Prabavathy VR, Mathivanan N, Murugesan K (2006) Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. *Biol Control* 39:313–319
- Punja ZK, Utkhede RS (2003) Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol* 21:400–407
- Quecine MC, Araujo WL, Marcon J, Gai CS, Azevedo JL, Pizzirani-Kleiner AA (2008) Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Lett Appl Microbiol* 47:486–491
- Roy AK, Mandal NL, Singh AN (2009) Screening of maize rhizobacteria against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* strains in relation to siderophore and HCN production. *Indian Phytopathol* 62:440–444
- Sant D, Casanova E, Segarra G, Avilés M, Reis M, Trillas MI (2010) Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on *Fusarium* wilt and water usage in carnation grown on compost-based growth medium. *Biol Control* 53:291–296
- Singh PP, Shin YC, Park CS, Chung YR (1999) Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89:92–99
- Taurian T, Anzuay MS, Angelini JG, Tonelli ML, Ludueña L, Pena D, Ibáñez F, Fabra A (2010) Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant Soil* 329:421–431
- Tondje PR, Roberts DP, Bon MC, Widmer T, Samuels GJ, Ismael A, Begoude AD, Tchana T, Nyemb-Tshomb E, Ndoumbe-Nkeng M, Bateman R, Fontem D, Hebban KP (2007) Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biol Control* 43:202–212
- Trillas MI, Avilés M, Ordovás J, Bello A, Tello JC (2002) Using compost as a methyl bromide alternative. *BioCycle* 43:64–68
- Trillas MI, Casanova E, Cotxarrera L, Ordovás J, Borrero C, Avilés M (2006) Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biol Control* 39:32–38
- Tuiter G, Szczech M, Bollen GJ (1998) Suppression of *Rhizoctonia solani* in potting mixtures amended with compost made from organic household waste. *Phytopathology* 88:764–773
- Weller DM, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS (2002) Microbial populations responsible

for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 40:309–348

Xia K, Kinkel LL, Samac DA (2002) Biological control of *Phytophthora* root rot on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biol Control* 23:285–295

Zheng Y, Xue QY, Xu LL, Xu Q, Lu S, Gu S, Guo JH (2011) A screening strategy of fungal biocontrol agents towards Verticillium wilt of cotton. *Biol Control* 56:209–216

## Author Biographies

**Raúl Castaño** is working on biological control of plant pathogens since 2007, conducted his Doctoral Thesis under the tutelage of Dr. Manuel Avilés. He was working previously in molecular biology in transgenic plants in the IRNASE-CSIC (Spain). His main interest is the use of biocontrol agents including bacteria and fungi and utilization of organic wastes against plant diseases. Presently, he is working in the company 'Agricultura y Ensayo, S.L.' as technician responsible of its laboratory.

**Celia Borrero** is a Researcher attached to the company 'Biocontrol Technologies S.L.' and University of Seville, Spain. Her research area mainly focuses on utilization of organic wastes in order to provide diseases suppressiveness and identifying potential biocontrol agents for integrated management of plant diseases.

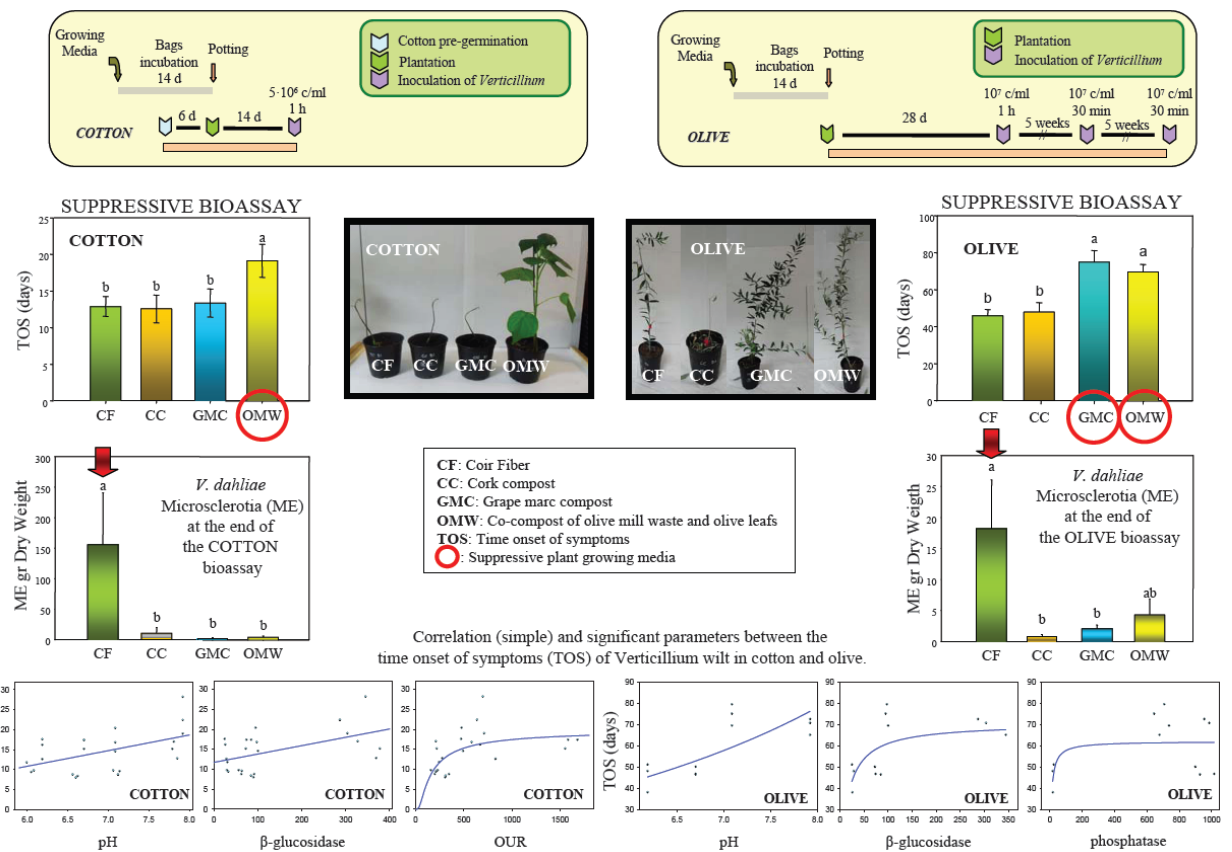
**M. Isabel Trillas** is a Professor of Plant Physiology based at Universitat de Barcelona, Spain. Her research area mainly focuses on characterization of organic wastes (composts) for biological control of plant diseases. She is also working on interaction of biological control agents–pathogens–plants.

**Manuel Avilés** is a Professor of Plant Pathology based at University of Seville, Spain. His research interest largely focuses on utilization of composts and identifying potential biocontrol agents for integrated management of plant diseases.

# CAPÍTULO 4

*Factores que afectan la capacidad de los medios de crecimiento para suprimir la Verticilosis vascular.*

## Abstract Gráfico





## FACTORES QUE AFECTAN LA CAPACIDAD DE LOS MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA SUPRIMIR LA VERTICILOSIS VASCULAR.

### Resumen

---

Las enfermedades causadas por *Verticillium dahliae* en cultivos como alcachofa, girasol, melocotón, tomate, pimiento, olivo y algodón son de mayor o menor importancia en España. Ciertos compost tienen la capacidad de suprimir enfermedades de las plantas y reducir al mínimo los residuos orgánicos, conduciendo a una reducción en el uso de fertilizantes y fungicidas en la producción de cultivos.

En este trabajo, tres medios de cultivo (compost de orujo de vid [OV], compost de corcho [CC] y un co-compostaje de alperujo y hojas de olivo [ALP]) se comparan con un sustrato estándar (fibra de coco, FC) en su potencial para suprimir la Verticilosis vascular (VV) en algodón (VC) y olivo (VO). Además, al inicio del ensayo, se analizaron propiedades químicas (pH y la conductividad eléctrica), propiedades enzimáticas (actividades  $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa alcalina y arilsulfatasa) y propiedades biológicas (tasa de consumo de oxígeno: OUR).

Los composts mostraron diferentes capacidades supresivas. El ALP fue el más supresivo contra VC y VO, retardando la aparición de los síntomas con respecto a la FC (en 6 y 24 días, respectivamente). El OV sólo suprimió la VO. Las variables que se correlacionaron significativamente con la severidad de la enfermedad fueron pH, actividad  $\beta$ -glucosidasa, actividad fosfatasa, y OUR. De los resultados se concluyó que el pH y la actividad  $\beta$ -glucosidasa podrían considerarse factores predictivos de la capacidad supresiva de estos composts contra VC y VO. Además, la OUR y la actividad fosfatasa sólo pueden ser considerados factores predictivos de la capacidad supresiva frente a VC y VO, respectivamente. Todos los parámetros mostraron correlaciones positivas con el tiempo hasta el inicio de los síntomas de la enfermedad. De hecho, las actividades  $\beta$ -glucosidasa y fosfatasa mostraron un mejor ajuste como una respuesta tipo saturación al inicio de los síntomas de VO.

Este trabajo indica que subproductos compostados del olivo son muy prometedores cuando se trata de controlar VO en sistemas orgánicos e integrados de la agricultura. La adición de este compuesto a sustratos utilizados para la producción de plantas de olivo también parece recomendable.





## Factors that affect the capacity of growing media to suppress *Verticillium* wilt

R. Castaño and M. Avilés

Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola. Departamento de Ciencias Agroforestales. University of Seville. Ctra. Utrera Km. 1 s/n 41013. Sevilla (Spain), [aviles@us.es](mailto:aviles@us.es)

**Keywords:** *Verticillium dahliae*, compost, olive, cotton, suppression.

### Abstract

Diseases caused by *Verticillium dahliae* in crops such as artichokes, sunflowers, peaches, tomatoes, peppers, olives and cotton are of varying importance in Spain. Certain composts have the capacity to suppress plant diseases while minimizing organic waste and they thus lead to a reduction in the use of fertilizers and fungicides in crop production. In this work, three growing media (grape marc compost, cork compost and a co-compost of olive mill waste and olive leaves) are compared with a standard substrate (coir fiber) in their potential to suppress *Verticillium* wilt in cotton (VC) and olive (VO). In addition, chemical properties (pH and electrical conductivity), enzymatic properties ( $\beta$ -glucosidase, alkaline phosphatase and arylsulfatase activities) and biological properties (oxygen uptake rate: OUR) were analyzed at the start of the bioassays. The composts show different suppressive capacities. The co-compost of olive mill waste and leaves was the most suppressive against VC and VO, delaying the onset of symptoms with respect to coir fiber (by 6 and 24 days, respectively). Grape marc compost only suppressed VO. The variables that were significantly correlated with disease severity were pH,  $\beta$ -glucosidase and phosphatase activities, and OUR. From the results, it was concluded that pH and  $\beta$ -glucosidase activity could be considered predictors of the suppressive capacity of these composts against VC and VO. Moreover, OUR and phosphatase activity can only be considered predictors of suppressive capacity against VC and VO, respectively. All the parameters showed positive correlations with the time until the onset of symptoms of the disease. Indeed,  $\beta$ -glucosidase and phosphatase activities were a best fit as a saturation-type response to the onset of symptoms of VO. This work indicates that composted olive by-products are very promising when it comes to controlling VO in organic and integrated agriculture systems. The addition of this compost to substrates used for the production of olive plants also seems recommendable.

### INTRODUCTION

*Verticillium* wilt caused by *Verticillium dahliae* Kleb. is one of the most destructive diseases in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) (Ma et al., 2002; Kurt et al., 2003) and olive (*Olea europaea* L.) crops (Jiménez-Díaz et al., 2011; López-Escudero and Mercado-Blanco, 2011) and it leads to significant reductions in plant biomass and yield. This pathogen can persist in soil or decomposed plant material as microsclerotia for more than 20 years (Kurt et al., 2003). The significance of this disease has resulted in worldwide efforts to control this pathogen.

Using composting biotechnology, raw by-products can be re-used in agriculture as eco-compatible and high-quality organic amenders and fertilizers. In particular, several reviews report that certain composts are highly effective for crop production as

they repress plant diseases, minimize organic waste and reduce the amount of fertilizers and fungicides required (Noble and Coventry, 2005; Alabouvette et al., 2006; Bonanomi et al., 2010). A question of practical importance is whether disease suppression can be predicted for a given batch or kind of compost (Janvier et al., 2007). The capacity to predict disease suppression on the basis of the characteristics of pure composts is highly desirable and would enable growers to choose the appropriate composts to control the diseases expected in a given crop (Termorshuizen et al., 2006).

This study assessed the suppressive effect of three composted growing media on cotton (VC) and olive (VO) *Verticillium* wilt. In addition, an attempt was made to identify and elucidate the relationships between certain mechanisms that determine the suppressiveness against VC and VO of these growth media.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plant Growth Media**

The suppressive capacity of three composted residues from agricultural waste against *Verticillium* wilt was evaluated in cotton and olive plants. The residues tested were as follows: cork compost (CC) from industrial cork residue (bark of *Quercus suber* L.), grape marc compost (GMC) from the wine industry (grape skins, seeds and stems), both of which have been used previously as suppressive media against *Fusarium* wilt diseases (Borrero et al., 2009; Castaño et al., 2011), and a co-compost of olive mill waste and olive leaves (OMC) from the olive oil industry. These residues were composted in piles and fertilized according to Carmona et al. (2004). The composts were compared with coir fiber (CF) (Cocopeat, Projar, Valencia, Spain), as a standard plant growth medium. In order to standardize initial conditions, all plant growth media were incubated in bags per repetition as described previously by Castaño et al. (2011).

### **Physicochemical and biological properties of plant growth media at the beginning of the bioassays**

After 14 days of incubation, several parameters of the growing media were examined. All measurements were taken before each bioassay. Electrical conductivity (EC) and pH (2:1, v/v) were determined according to Handreck and Black (1991) (Table 1). Three samples of each medium were analyzed. Enzymatic activities in the growing media were determined via measurements of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase (alkaline phosphatase) and arylsulfatase, as described by Tabatabai (1994). The substrates used for the enzymatic reactions were *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside, *p*-nitrophenyl sulphate and *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma Aldrich Chemical Co, St Luis, USA). The product *p*-nitrophenyl was determined by measuring absorbance at 410 nm. Three samples were assessed for each growing medium. Control treatments were also assessed for each substrate. Enzyme activity results were reported in relation to dry-weight, achieved by keeping the growing media in a for 24 h at 105°C. Oxygen uptake rate (OUR) was measured using the OxiTop system (OxiTop, Weiheim, Germany). A total of 25 g of each substrate was placed in a respirometer jar and incubated for 5 days at 20°C. When the temperature in the incubator equilibrates, subsequent carbon dioxide absorption by NaOH creates a drop in pressure, which is measured by a sensor. The oxygen consumption can be calculated from the pressure difference.

### **Suppressive bioassays**

Two weeks after incubation, the growing media were fertilized with 1 g cm<sup>-3</sup> of Peters' foliar feed and 4 g cm<sup>-3</sup> of Osmocote (5-6 months; 18+10+11+2MgO+Te). Five

pots were filled with 800 ml of substrate for each treatment. Bioassays were carried out with two crops: cotton cv. 'Carlota' and olive cv. 'Arbequina'.

Cotton seeds were pre-germinated in a box containing wet filter paper at 25°C for seven days. Three pre-germinated cotton seeds were sown per pot. Five days after sowing, the two weakest seedlings were removed from each pot. The cotton seedlings were grown for 14 days in a grow chamber at 25°C (day) and 23°C (night), with a 16:8 h light:dark photoperiod (photosynthetically active radiation intensity 280  $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) and 60% -70% relative humidity. After this time, each pot was placed in a plastic bag, which was in turn put into an empty pot. An isolate of *Verticillium dahliae* defoliant (isolate V25) obtained from a diseased olive tree was used as the pathogen. The Inoculum was applied at a dose of  $5 \cdot 10^6$  conidia per ml solution. A total of 400 ml of the inoculum solution was added to each pot and remained in the substrate for 1 h. The pots were then drained and incubated at 90% relative humidity for 3 days in the dark. Controls were treated in the same way using water. Plants were watered every 2-3 days with tap water.

Olive bioassays were performed using one-year-old plants (Todolivo, Córdoba, Spain) as bare-root cuttings. Olives were planted in pots containing one of the growth media and grown for 2-3 weeks in the same conditions as for cotton bioassay. Inoculation was similar to that in the cotton bioassay, with an inoculum density of  $1 \cdot 10^7$  conidia per ml of solution. Two re-inoculations were conducted at the same density, at 5 week intervals. In the re-inoculations, the inoculant remained in the substrate for 30 min.

Disease was registered as the day on which the plants first showed symptoms of *Verticillium* wilt (the time until the onset of symptoms, TOS). Bioassays were performed with randomized complete block design. The experimental design involved 3 blocks x 4 plant growing media x 2 inoculated with the pathogen and non-inoculated = 24 experimental units. Each experimental unit involved 5 pots. Severity data were calculated as the means of each experimental unit per growing media (n=3). Cotton bioassay was repeated twice (n=6). None of the plants grown in the four non-inoculated control media showed signs of weakness or toxicity during cultivation nor did they develop symptoms of *Verticillium* wilt (data not shown).

### **Microsclerotia quantification**

At the end of the bioassays, the growing media from the rhizosphere for each treatment and bioassay were collected and air-dried for 4 weeks. In order to quantify the density of *V. dahliae* microsclerotia, the growing media were plated onto semi-selective media MSE (López-Escudero et al., 2007). Twenty-five g per treatment was used.

### **Statistical Analysis**

The effect of the growth medium on TOS was analyzed by ANOVA. Significant means were compared in each bioassay by crop using Duncan's test ( $P < 0.05$ ). TOS data were transformed for analysis with the  $\sqrt{x}$ . Overall relationships between TOS and growing media parameters were analyzed by regression analysis. The data collected from all the bioassays were analyzed with Statgraphics Plus (version 6; Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, 2002).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The capacity of the composts to suppress *Verticillium* wilt differed. OMC was the most suppressive medium for both pathosystems and delayed the onset of symptoms with respect to CF (by 6 and 24 days, respectively) (Fig. 1). Furthermore, VO was also

suppressed by GMC (Fig 1b). This delay in time onset of symptoms indicates a reduction in the potential of the initial inoculum in these growing media. CF and CC were conducive media for both pathosystems. The suppressive capacity of OMC is associated with its microbial community (Lima et al., 2004) and the presence of phenolic substances, which are characteristic of this kind of material (Al-Mughrabi et al., 2001, Lima et al., 2008).

The pH and  $\beta$ -glucosidase activity (for both VC and VO) and OUR and phosphatase activity (for only VC and VO, respectively) showed positive correlations with TOS (Table 1). Biotic parameters such as  $\beta$ -glucosidase and phosphatase activities and OUR, were best fit as a saturation-type response to TOS for *Verticillium* wilt (Fig. 2). These biotic parameters indicated greater microbial activity in the experimental composts than in CF.

Few studies have addressed which parameters are related to the capacity of composts to suppress *Verticillium* wilt. As in other diseases, the pH and microbial activity ( $\beta$ -glucosidase) of composts (GMC and CC) have been used as predictors of suppressiveness against tomato and carnation *Fusarium* wilt (Borrero et al., 2004, 2009). However, enzyme assays using  $\beta$ -glucosidase and phosphatase activities also gave rise to consistent positive correlations in a number of pathosystems using organic soil amendments (Bonanomi et al., 2010). In the present study, OUR was positively correlated to suppressiveness against VC. In contrast, a negative correlation between suppression of eggplant *Verticillium* wilt and respiration was reported in growing media amended with composts (Termorshuizen et al., 2006). Nevertheless, the addition of olive oil mill waste water to soil has been reported to increase soil respiration as a result of a shift in the microbial community, thereby inducing suppressiveness against *Rhizoctonia solani* in lettuce (Kotsou et al., 2004).

In both pathosystems, CF recorded the highest density of microsclerotia (Fig. 3). This finding was consistent with the CF medium being conducive to *Verticillium* wilt (Fig. 1). All the composts showed a lower density of microsclerotia, which was not consistent with the suppressiveness detected for all of them. Although CC was a conducive medium (Fig. 1), the density of microsclerotia was similar to that of the other composts. GMC and OMC showed reduced microsclerotia density (Fig. 3); however, the former did not suppress VC (Fig. 1). It has been shown that organic amendments reduce the soil density of *V. dahliae* in cotton (López-Escudero et al., 2007) and olive (Lima et al., 2008) crops. Degradation products, antibiotic compounds, and the microbial population of composts and amendments have been associated with this reduction in inoculum density (Lima et al., 2004, 2008; Bonanomi et al., 2006; López-Escudero et al., 2007; Malandraki et al., 2008). Probably, it could be relate with the maintenance of viable microsclerotia of *V. dahliae* in the growing media used in this study.

## CONCLUSIONS

On the basis of our results, we conclude that OMC is the most suppressive growth media for *Verticillium* wilt in cotton and olive crops. Moreover, GMC showed suppressiveness only against VO. All the composts reduced the density of microsclerotia in cotton and olive rizospheres. We propose that composts derived from olive by-products would be useful in suppressing VC and VO in organic and integrated agriculture systems.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from the Spanish *Ministerio de Educación y Ciencia* (AGL2005-08137-C03-02), the regional Andalusian authority's *Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía* (P06- AGR-02313) and the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación* (AGL2008- 05414-C03-01). Thanks to A. Gata for excellent technical assistance.

### Literature Cited

- Alabouvette, C., Olivaion, C. and Steinberg, C. 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. *Eur. J. Plant Pathol.* 114:329-341.
- Al-Mughrabi, K.I., Aburjai, T.A., Anfoka, G.H. and Shahrour, W. 2001. Antifungal activity of olive cake extracts. *Phytopathol. Medit.* 40:240-244.
- Bonanomi, G., Giorgi, V., Giovanni, D.S., Neri, D. and Scala, F. 2006. Olive mill residues affect saprophytic growth and disease incidence of foliar and soilborne plant fungal pathogens. *Agric. Ecos. Environ.* 115:194-200.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M. and Scala, F. 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biol. Biochem.* 42:136-144.
- Borrero, C., Trillas, M.I., Ordovás, J., Tello, J.C. and Avilés, M. 2004. Predictive factors for the suppression of Fusarium wilt of Tomato in plant growth media. *Phytopathology* 94:1094-1101.
- Borrero, C., Trillas, M.I. and Avilés, M. 2009. Carnation Fusarium Wilt suppression in four composts. *Eur. J. Plant Pathol.* 123:425-433.
- Carmona, E., Avilés, M., Domínguez, I., Moreno, M.T., Pajuelo, P. and Ordovás, J. 2004. Exploitation of composted agricultural wastes as growing media. In: Bernal, M.P., Moral, R., Clemente, R., Paredes, C. (Ed.), *Sustainable organic waste management for environmental protection and 414 food safety*, vol. I. Ramiran 2004. Proceedings of the 11th International Conference of the FAO ESCORENA Network on the Recycling of Agricultural Residues in Agriculture, 2004. Murcia, Spain, pp. 141–144.
- Castaño, R., Borrero, C. and Avilés, M. 2011. Organic matter fractions by SP-MAS <sup>13</sup>C NMR and microbial communities involved in the suppression of Fusarium wilt in organic growth media. *Biol. Control* 58:286-293.
- Handreck, K. and Black, N. 1991. *Growing media for ornamental plants and turf*. Kensington, Australia: New South Wales University Press.
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T. and Steinberg, C. 2007. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biol. Biochem.* 39:1-23.
- Jiménez-Díaz, R.M., Olivares-García, C., Landa, B.B., Jiménez-Gasco, M.M. and Navas-Cortés, J.A. 2011. Region-wide analysis of genetic diversity in *Verticillium dahliae* populations infecting olive in southern Spain and agricultural factors influencing the distribution and prevalence of vegetative compatibility groups and pathotypes. *Phytopathology* 101:304-315.
- Kotsou, M., Mari, I., Lasaridi, K., Chatzipavlidis, I., Balis, C. and Kyriacou, A. 2004. The effect of olive mill wasterwater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Appl. Soil Ecol.* 26:113-121.
- Kurt, S., Sibel, D. and Sahinler, S. 2003. Sensitivity of *Verticillium dahliae* to prochloraz and prochloraz–manganese complex and control of Verticillium wilt of cotton in the field. *Crop Prot.* 22:51-55.
- Lima, G., Piedimonte, D., De Curtis, F., Abobaker-Elgelane, A., Nigro, F., D'Onghia, A.M., Alfano, G. and Ranalli, G. 2004. Suppressive effect of composted olive oil by-

- products towards *Verticillium dahliae* and other fungal pathogens. *5th Int. Symp. on Olive Growing*, Izmir, Turkiye, 27 Sept–2 Oct., pp. 64 (Abs).
- Lima, G., Piedimonte, D., De Curtis, F., Abobaker Elgelane, A., Nigro, F., D'Onghia, A.M., Alfano, G. and Ranalli, G. 2008. Suppressive effect of cured compost from olive oil by-products towards *Verticillium dahliae* and other fungal pathogens. *Acta Hort.* 791:585-591.
- López-Escudero, F.J., Mwanza, C. and Blanco-López, M.A. 2007. Reduction of *Verticillium dahliae* microsclerotia viability in soil by dried plant residues. *Crop Prot.* 26: 127-133.
- López-Escudero, F.J. and Mercado-Blanco, J. 2011. *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil.* 344:1-50.
- Ma, C., Jian, G.L. and Meng, C.L. 2002. The Advances in Cotton Breeding Resistance to Fusarium and Verticillium Wilts in China During Past Fifty Years. *Sci. Agricul. Sinica.* 35:508-513.
- Malandraki, I., Tjamos S.E., Pantelides, I.S. and Paplomatas, E.J. 2008. Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biol. Control.* 44:180-187.
- Noble, R. and Coventry, E. 2005. Suppression of soil-borne plant diseases with composts: a review. *Biocontrol Sci. Tech.* 15:3–20.
- Tabatabai, M.A. 1994. Soil enzymes. In *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, 2 ed. Weaver, R.W., Angle, J.B. and Bottomley, P.S. pp. 775–833. Madison, WI: Soil Science Society of America.
- Termorshuizen, A.J., van Rijn, E., van der Gaag, D.J., Alabouvette, C., Chen, Y., Lagerlöf, J., Malandrakis, A.A., Paplomatas, E.J., Rämert, B., Ryckeboer, J., Steinberg, C. and Zmora-Nahum, S. 2006. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: variability in pathogen response. *Soil Biol. Biochem.* 38:2461–2477.

## **Tables**

Table 1. Correlation (simple) between the time onset of symptoms (TOS) of *Verticillium* wilt in cotton and olive and the significant parameters of the growing media assessed at the beginning of the bioassays.

<b>Crop</b>	<b>Variables</b>	<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	<b>P<sup>1</sup></b>	<b>Equation</b>
Cotton	pH	25.53	*	TOS= -12.6253+3.9089*pH
	β-glucosidase	25.59	*	TOS= 11.7193+0.0209015*β-glucosidase
	OUR	39.28	**	TOS= exp(2.98928-131.55/OUR)
Olive	pH	60.26	**	TOS=1/(-0.0185833+0.251102/pH)
	β-glucosidase	49.51	*	TOS=1/(0.0141509+0.220902/ β-glucosidase)
	phosphatase	38.88	*	TOS=1/(0.0160997+0.119633/phosphatase)

<sup>1</sup> Significance levels: \* and \*\* indicate  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

## Figures

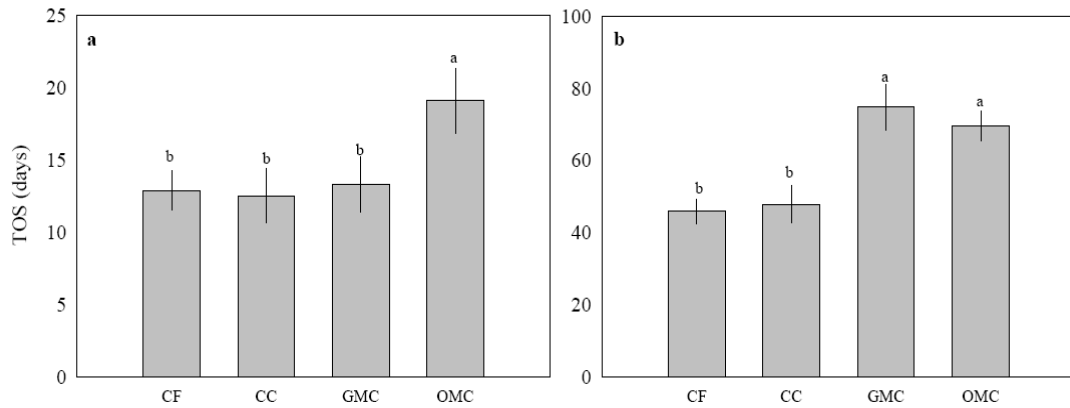


Fig.1. Time onset of symptoms (TOS) for cotton (a) and olive (b) in four growing media inoculated with *Verticillium dahliae*. GMC: grape marc compost; CC: cork compost; OMC: co-compost of olive mill waste and olive leaves; CF: coir fiber. TOS data were transformed for analysis with the  $\sqrt{x}$ . Bars with the same letter are not significantly different according to Duncan's test at  $P < 0.05$ . Standard error of the mean is indicated by vertical line (cotton,  $n=6$ ; olive,  $n=3$ ).

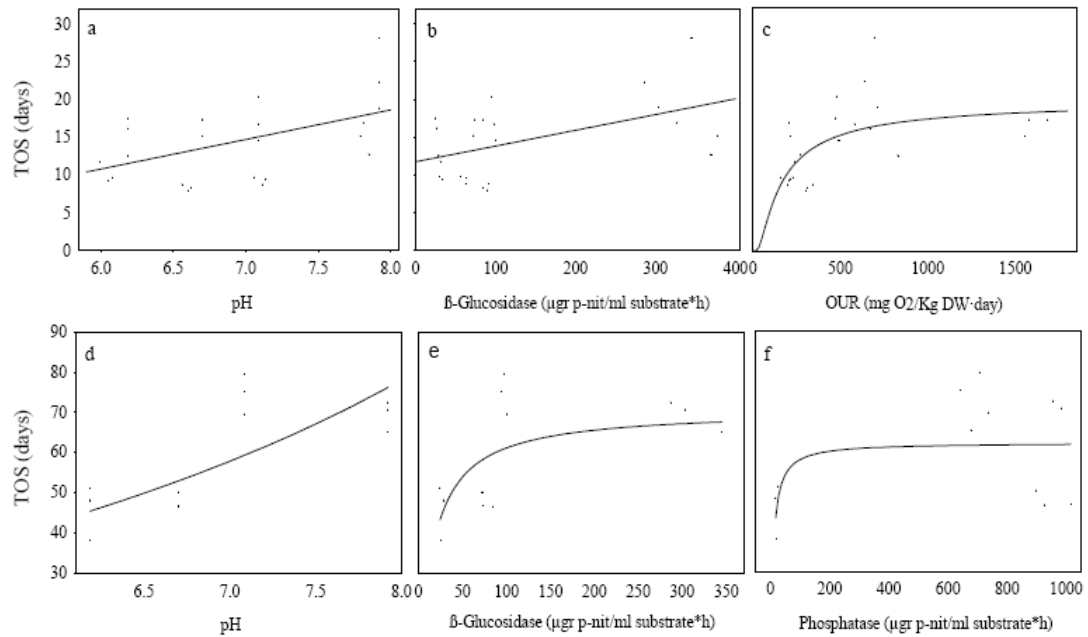


Fig. 2. Correlation between the time onset of symptoms (TOS) and different parameters of the growing media inoculated with *Verticillium dahliae*. Regressions obtained from cotton (a-c) and olive (d-f) assays.

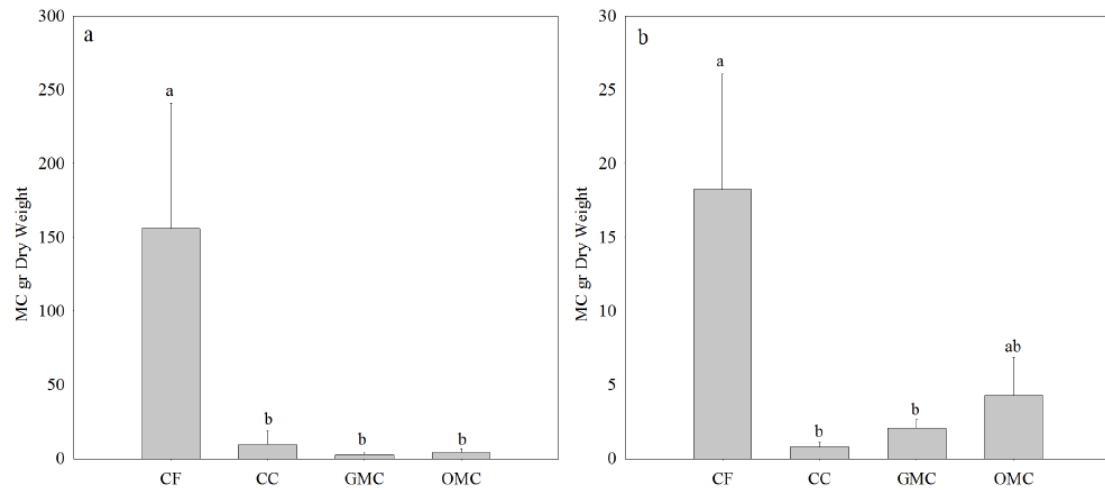


Fig. 3. Microsclerotia (MC) density in the rhizosphere of cotton (a) and olive (b) plants in growing media inoculated with *V. dahliae*. Microsclerotia were assessed on semi-selective media. GMC: grape marc compost; CC: cork compost; OMC: co-compost of olive mill waste and olive leaves; CF: coir fiber. Data on microsclerotia were transformed for analysis with  $\log(x)$ . Bars with the same letter are not significantly different according to LSD test at  $P < 0.05$ . Standard error of the mean is indicated by vertical line (cotton,  $n=3$ ; olive,  $n=3$ ).



## **DISCUSIÓN GENERAL**



## DISCUSIÓN GENERAL

Este trabajo de tesis aborda dos aspectos asociados al control biológico de enfermedades en horticultura. Primero se pretende caracterizar la composición racial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en el suroeste de la provincia de Cádiz –zona tradicional del cultivo del clavel– paso necesario para la elección de variedades con resistencia y para diseñar un adecuado programa de mejora vegetal. En segundo lugar se pretende caracterizar y dilucidar la supresividad natural de sustratos formulados con composts y su enriquecimiento con agentes de control biológico frente a ciertas traqueomicosis (fusariosis y verticilosis).

La determinación de la diversidad genética y racial en las poblaciones de patógenos en una región determinada es recomendable y relevante, proporcionando una información básica con una alta trascendencia práctica (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). Así, esta información resulta valiosa para el desarrollo de programas de mejora vegetal que proporcionen cultivares resistentes, incluso, a las distintas razas del patógeno presente en una zona. Esta tesis comprende un extenso capítulo (ver capítulo 1) donde se estudia la prevalencia racial de Fod en una zona con una alta tradición en el cultivo del clavel, con una superficie muestreada lo suficientemente amplia como para objetarse que nuevas zonas pudieran producir resultados diferentes.

La constancia de que Fol raza 2 ha desplazado a Fol raza 1 en España (Tello y Lacasa, 1988) apuntan a que Fod, con unas diez razas diferentes documentadas, necesita un profundo estudio racial en la zona más importante del cultivo del clavel en España.

En nuestro trabajo ambos estudios, molecular y fenotípico, apuntan a una mayor prevalencia racial de Fod raza 2 en la zona estudiada, raza netamente predominante en España y en el resto de Europa (Melero-Vara et al., 2005; Prados-Ligero et al., 2007). Respecto a las otras razas, aunque molecularmente hablando Fod raza 1 y 8 son indistinguibles (Migheli et al., 1998; Chiochetti et al., 1999), fenotípicamente pueden ser diferenciadas usando el cultivar “New Elsy”. Todos los aislados que fueron seleccionados para el test de patogenicidad se comportaron como Fod raza 1. Además,

dado que Fod raza 8 no ha sido documentada en esta zona, podríamos concluir que Fod raza 1 sería la siguiente en prevalencia tras la raza 2.

Por otra parte, este estudio evidenció una alta homogeneidad intra-racial entre los aislados de Fod testados. Un estudio previo similar realizado en la misma zona concluyó que existía una alta diversidad genética intra-razas de Fod, resultando en diferencias en su agresividad (Gómez-Lama et al., 2012). Pero el uso de técnicas moleculares de huella genética usando RAPD-PCR podría llevar a confusión si los aislados estudiados son *F. oxysporum* no obtenidos exclusivamente de plantas enfermas, sino de suelos donde, posiblemente, la enfermedad estuviera presente. Lori et al. (2004) reportó, usando otro método de huella genética (RFLP de la región ribosomal IGS), la gran diversidad que existía entre aislados de *F. oxysporum* obtenidos de plantas enfermas y los obtenidos del mismo suelo y, en cambio, la alta homogeneidad intra-racial de Fod obtenidos de planta enferma. Análogamente, un resultado similar a este se obtuvo con aislados de Fod, obtenidos en Italia, usando la técnica RAPD-PCR (Migheli et al., 1998).

En cuanto a los aislados agrupados como Fod raza 2, tres de ellos presentaron una modificación en la secuencia molde de los primers específicos y una alta severidad en los test de patogenicidad. Estos datos podrían indicar la presencia de una subpoblación de Fod raza 2 surgida evolutivamente de la población patógena preexistente en la zona. Apoyando esta idea, existen hipótesis previas donde se expone que cambios evolutivos en la diversidad de Fod podría ser la causa de la aparición de síntomas de Fusariosis Vascular en claveles, a priori, resistentes o altamente tolerantes a la enfermedad (Prados-Ligero et al., 2007), debido probablemente a la presencia de una elevada presión selectiva.

Respecto a los sustratos formulados con composts usados en este estudio, estos presentaron diferencias en función del patosistema usado. Con las Fusariosis vasculares del clavel y del tomate, los resultados obtenidos con el compost de orujo de vid (OV) y el compost de corcho formulado (CC) fueron similares a los de estudios previos usando estos materiales; si bien son lotes distintos que varían en la campaña y en las variaciones intrínsecas a cualquier proceso de compostaje (Borrero et al., 2004, 2006, 2009).

Además, tan interesante resulta conocer el valor supresivo de sustratos formulados con composts como conocer, con más detalle, los factores que inducen esa supresividad natural. El empleo de estos composts como componentes de sustratos hortícolas induce supresividad natural frente a las Fusariosis y Verticilosis vasculares mostradas en estos estudios. Pero mucho se ha especulado y estudiado sobre los mecanismos que sustenta este fenómeno supresivo natural.

La rizodeposición de productos y exudados vegetales no proporciona, claramente, las adecuadas cantidades de energía para que los ACB puedan sostener un adecuado control biológico (Boehm et al., 1997; Hoitink y Boehm, 1999). Se piensa que para que exista un control efectivo es esencial un umbral mínimo en la cantidad de energía biodisponible en forma de Materia Orgánica (MO). Por lo tanto, la MO de estos composts juega un papel determinante en la regulación y en el mantenimiento de las poblaciones microbianas responsables, en la mayoría de los casos, del efecto supresivo (Hoitink et al., 1993a). En nuestros materiales esa concentración de fuentes carbonadas es variable y, en general, debemos esperar (y obtuvimos) mayor presencia de compuestos carbonados disponibles para la microbiota en los composts y menor cantidad en la fibra de coco, sustrato utilizado como referencia para las comparaciones (testigo).

La técnica MAS  $^{13}\text{C}$  NMR (RMN) es una técnica espectroscópica no destructiva que permite la cuantificación de determinadas fracciones de la MO. Por tanto, permite conocer los cambios en la composición química de la MO del suelo o sustrato tras cualquier proceso (Chen e Inbar., 1993; Simpson y Preston, 2007), y así, en nuestro caso, asociar el consumo de esas fracciones a la microbiota tras un ensayo en distintos sustratos en la que supresividad hubiera o no ocurrido (Hoitink y Boehm, 1999). La técnica RMN ha sido, en principio, ampliamente usada para el estudio evolutivo de la materia orgánica durante el proceso de compostaje (Chen e Inbar., 1993). Su aplicación como posible indicador de sustratos con características supresivas es un campo de la ciencia que aún se encuentra en su “infancia” (Hoitink y Boehm, 1999). Además, el uso de esta técnica ha sido recientemente incluida entre el grupo de técnicas prometedoras para la identificación de medios de crecimiento vegetal con características supresivas (Bonanomi et al., 2010).

Los polímeros carbohidratados son las fuentes de nutrición de carbono más importantes para el mantenimiento de las comunidades microbianas, principalmente las consistentes en celulosa y hemicelulosa. Mediante el uso de la técnica RMN, Boehm et al. (1997) observaron una relación positiva entre niveles de celulosa y la supresión de *Pythium ultimum* en poinsettia. Igualmente, Stone et al. (1997), usando otra técnica espectroscópica complementaria a la RMN (DRIFT), determinaron que la concentración de celulosa y lignina de un compost definen la longevidad del efecto supresivo.

Al contrario que estos trabajos, nuestros estudios con RMN determinaron que la **región de estructuras polisacáridicas** (60-110 ppm), donde la celulosa representa la mayor fracción polisacárida (Boehm et al., 1999; Forte et al., 2006), no es un buen indicador de material supresivo. Una elevada abundancia relativa de esta región no tiene porqué indicar altos valores de celulosa. La posible existencia de un efecto ‘apantallamiento’, debido a que componentes ligno-celulósicos resuenan en esta región (Hammond et al., 1985; Adani et al., 2006; Forte et al., 2006), y la nula discriminación entre celulosa biodisponible y no biodisponible han sido reportados como datos que avalan la tesis de que la concentración de celulosa es un valor erróneo de medida de sustrato supresivo, al menos con los medios de cultivo estudiados.

En cambio, en la **región carboxyl y de grupos ésteres** (160-190 ppm), existe un pico que resuena a 175 ppm que es característico de los carbonos metilos y carboxílicos de los grupos acetilos unidos a la hemicelulosa (Forte et al., 2006). Nuestros datos aportan evidencias de que este pico presenta una abundancia relativa asociada con la supresividad natural a la Fusariosis vascular mostrada en los tres medios de crecimiento vegetal. Similarmente, Pane et al. (2011) observaron una correlación negativa entre esta región y la severidad a la enfermedad del patosistema *P. ultimum/Lepidium sativum* L.

Con respecto a las densidades poblacionales de grupos eco-nutritivos de microorganismos al comienzo de los ensayos, destaca principalmente los altos valores de actinomicetos celulolíticos y las ratios OA/OB y CA/CB encontrados en el OV. Estos valores indican una mayor predominancia de actinomicetos respecto a bacterias en las comunidades microbianas respecto a CC y, más claramente, CF. Esto refuerza la teoría aportada por el estudio RMN, puesto que los actinomicetos consumen productos

de ruptura de la hemicelulosa (Sole-Mauri et al., 2007), indicando que mayores cantidades de hemicelulosa podrían albergar mayores poblaciones de actinomicetos posiblemente relacionados con el fenómeno del biocontrol.

Por otra parte, la alta densidad poblacional de *Bacillus* spp. asociada a nuestros composts es debido a que las altas temperaturas del compostaje seleccionan a este tipo de microorganismos. Éstos son conocidos antagonistas de las Fusariosis (Khan y Khan, 2001), por lo que deben contar también en la supresividad de dichos composts.

Con el patosistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*/tomate quisimos profundizar más en el fenómeno supresivo de los materiales ensayados, estudiando la consecuencia de la aplicación de dos agentes de control biológicos (ACBs), obtenidos de ambientes supresivos, a medios de crecimientos vegetal con supresividad conocida.

Así, a partir de 584 aislados obtenidos de rizosfera supresiva, se obtuvieron 2 potenciales ACBs: el aislado **305** (*Fusarium solani*) y el aislado **A19** [*Streptomyces* sp.; actinomiceto celulolítico]. En la bibliografía existen numerosos trabajos que asocian el control de las diversas enfermedades vegetales con la aplicación de actinomicetos del género *Streptomyces* (Singh et al., 1999; El -Tarabily et al., 2000; Doumbou et al., 2002; Xia et al., 2002; Coombs et al., 2004; Prabavathy et al., 2006; Kim y Hwang, 2007; Quecine et al., 2008) y *Fusarium* spp. no patogénicos (Larking y Fravel, 1998, 1999, 2002; Weller et al., 2002; Alabouvette et al., 2009; Zheng et al., 2011). En cambio, hay muy pocos estudios sobre el biocontrol por *Fusarium* spp. no patogénicos pertenecientes a otra especie diferente a *F. oxysporum*. Entre los pocos representantes, dos aislados no patogénicos de *F. solani* se han comportado como ACBs frente a las fusariosis vasculares del melón, tomate, albahaca y sandía (Larkin y Fravel, 1998 y 1999).

Respecto a la supresividad, y como era de esperar, el OV no mejoró sus niveles de supresividad natural con la adición de los ACB. Sólo un aislado, el aislado A19, presentó una mejora en la supresividad del CC equiparándola a la mostrada por el OV. Los mecanismos de biocontrol que sustentan estos sustratos han sido discutidos en estudios previos (Borrero et al., 2004, 2005, 2006, 2009; Trillas et al., 2006). Estos mecanismos de biocontrol, asociados con la supresión natural presente en estos

composts, podrían estar parcialmente asociadas con la microbiostasis (Borrero et al., 2009). Debido a ello, la alta competencia microbiana en estos composts afectaría tanto al patógeno como a los ACBs introducidos. Particularmente en el OV, donde la introducción de los ACBs no condujo a ninguna mejora. Este estudio sugiere, por tanto, la dificultad de mejorar cualquier composts capaz de controlar la Fusariosis vascular del tomate con la adición de ACBs, cuando sus niveles de supresividad son similares a los del OV. Por el contrario, el medio conductivo FC, ampliamente empleado debido a sus buenas propiedades físicas (Abad et al., 2002), mostró unos niveles de supresividad similares a los que presentaba el CC tras la adición de los dos ACBs.

El estudio poblacional al inicio y al final del ensayo proporcionó una información esencial de la dinámica poblacional de ambos aislados. Estos aislados se establecieron mejor en aquellos medios de crecimiento vegetal donde no fueron aislados. En cambio, el aislado A19 fue el que mejoró la supresividad del CC. Posiblemente, este actinomiceto celulolítico podría mejorar la reducción de la severidad si se hubiese aplicado a dosis mayores, debido a que CC (sustrato origen de este aislado) libera celulosa lentamente (Trillas et al., 2006). Este efecto dosis ha sido ampliamente discutido en relación con el modo de acción de los ACBs (Larkin y Fravel, 1998 y 1999; Mandeel y Baker, 1991; Alabouvette et al., 2006).

Aunque el modo de acción de los ACBs no fue el objetivo de su elección en el screening (fue su eficacia contra la Fusariosis vascular del tomate), el posible modo de acción del aislado 305 podría ser inferido a partir de los datos poblacionales. Así, la densidad poblacional del aislado 305 fue superior en los medios CC y FC frente al patógeno. Este resultado indica que el aislado 305 podría ejercer un posible mecanismo de competición frente al patógeno. Debido a que los modos de acción de los ACBs no son excluyentes entre sí (Hoitink et al., 1993b; Larkin y Fravel, 1998; Weller et al., 2002; Zheng et al., 2011), un posible efecto inductor de resistencia sistémica (IRS) podría ser estudiado en un futuro para el aislado 305, puesto que se han observado evidencias de este efecto IRS en sandía y tomate con un aislado *Fusarium solani* CS-1 (Larkin y Fravel 1998).

La producción total de tomates tampoco fue mejorada en gran medida tras la adición de los ACBs en los composts. Un incremento significativo del 34% fue



observado en CC sin presencia de patógeno cuando el aislado A19 fue aplicado. Posiblemente, este incremento podría deberse a un posible efecto promotor del crecimiento, previamente reportado en otros estudios donde aislados actinomicetos fueron usados (Doubou et al., 2002; El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006). En cambio, sí destaca el incremento significativo del 22% en la FC cuando se le aplicó el aislado A19 en presencia del patógeno. Paralelamente, el aislado 305 incrementó la producción en este sustrato, aunque de manera no significativa.

La evidencia en el uso de OV y CC como sustratos supresivos a las Fusariosis del clavel y del tomate los convierte en potenciales candidatos para el estudio como sustratos supresivos a las verticilosis vasculares. Frente a estos, un nuevo sustrato, el alperujo formulado con compost mezclado con hojas (ALP) fue ensayado.

En los patosistemas *Verticillium dahliae*/algodón (VA) y *Verticillium dahliae*/olivo (VO) se obtuvieron diferentes resultados. El OV sólo presentó supresividad en el patosistema VO, al igual que el ALP, que sí presentó supresividad en el patosistema VA. Existen estudios previos donde residuos de la industria del aceite formulado con composts se ha mostrado supresivo frente a diversas enfermedades vegetales, asociando su comunidad microbiana (Lima et al., 2004) y la presencia de sustancias fenólicas (Al-Mughrabi et al., 2001; Lima et al., 2008), propias de este tipo de materiales, como las responsables de la capacidad supresiva de estos materiales.

Las variables que mostraron una correlación significativa con la severidad registrada fueron el pH, la actividad  $\beta$ -glucosidasa para VA y VO. Por otra parte, la tasa de consumo de oxígeno (OUR) y la actividad fosfatasa mostraron correlación positiva con VA y VO, respectivamente. Todas mostraron correlaciones positivas con el inicio de síntomas de la enfermedad. Tanto el pH como la actividad  $\beta$ -glucosidasa de sustratos formulados con composts han sido previamente citados como variables relacionadas con la supresividad a otras enfermedades, como la Fusariosis vascular del clavel (Borrero et al., 2004) y del tomate (Borrero et al., 2009).

Los parámetros biológicos tales como las actividades enzimáticas  $\beta$ -glucosidasa y fosfatasa y el OUR mostraron, como mejor ajuste, una respuesta tipo saturación respecto al inicio de síntomas. Estos parámetros indicaron una mayor actividad

microbiana en los composts respecto a la FC. Estas actividades enzimáticas también han mostrado correlaciones positivas usando enmiendas orgánicas frente a ciertos patosistemas (Bonanomi et al., 2010). En cambio, el OUR ha manifestado resultados contradictorios, mostrando correlaciones negativas con la supresividad a la enfermedad en el patosistema *Verticillium dahliae*/berenjena (Termorshuizen et al., 2006) y correlaciones positivas en el patosistema *Rhizoctonia solana*/lechuga (Kotsou et al., 2004). En este último destaca la adición de agua residual de almazara al suelo, inductor de un cambio en la comunidad microbiana que condujo a un aumento en la tasa de respiración.

Respecto a la densidad de microesclerocios al final de los ensayos, salvo el CC, dos composts (OV y ALP) y el sustrato conductivo FC revelaron un número de esclerocios a corde con la severidad mostrada, menor número de esclerocios mayor supresividad. Estudios previos exponen enmiendas orgánicas capaces de reducir la densidad de microesclerocios de *V. dahliae* en algodón (López-Escudero et al., 2007) y el olivo (Lima et al., 2008). Como factores asociados a este efecto supresivo se han señalado los productos de degradación, los antibióticos y las poblaciones microbianas residentes en los composts y en las enmiendas (Lima et al., 2004, 2008; Bonanomi et al., 2006; López-Escudero et al., 2007; Malandraki et al., 2008).

# **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

- 1.- La raza 2 es la más prevalente y frecuente dentro de la población de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod) en la zona del noroeste de Cádiz.
- 2.- El estudio poblacional mostró una alta homogeneidad intra-racial entre los aislados testados, destacando principalmente el uso de la secuencia del gen *TEF-1 $\alpha$*  como marcador molecular, capaz de discriminar aislados patógenos de Fod a nivel de raza, sin posibles errores por el uso de primers raciales *poco*-específicos o por errores de homoplasia, introducidos por técnicas filogenéticas como RAPD-PCR.
- 3.- Los primers específicos de raza de Fod mostraron 10 aislados con una amplificación específica de Fod raza 1 u 8 retardada, los cuales fueron filogenéticamente agrupados aparte a los aislados Fod y clasificados según secuencia del gen *TEF-1 $\alpha$*  como *F. proliferatum*.
- 4.- La presencia de aislados con retardo en la banda específica de raza 1 u 8 evidenciaron una inserción de 17 nucleótidos localizados aguas abajo a la región ITR 3' (inverted terminal repeat) del transposón *Fot1* respecto a los aislados de Fod, indicando dos eventos: la inespecificidad de estos primers y la existencia de una posible transferencia génica horizontal entre especies del género *Fusarium*, diferenciando aislados patógenos de no patógenos.
- 5.- Los estudios filogenéticos agruparon a 7 aislados no patógenos en 3 clusters según RAPD-PCR y 1 cluster según gen *TEF-1 $\alpha$* . Estos aislados podrían tratarse de aislados saprófitos no patógenos asociados con la rizosfera del clavel.
- 6.- Tres aislados fueron agrupados como Fod raza 2 según filogenia, presentando la misma virulencia diferencial que esta raza, sin presentar amplificación específica de esta, indicando la posible presencia de un subgrupo de Fod raza 2 en esta región.
- 7.- El diferente efecto supresivo mostrado para las Fusariosis vasculares del clavel y del tomate con los sustratos compost de orujo de vid (OV) y compost de corcho (CC) son similares a los mostrados por estos mismos composts de otras campañas (distintos lotes).
- 8.- En materiales como la fibra de coco (FC), el alto contenido de estructuras tipo lignina podría enmascarar valores en la región de carbohidratos, alterando una posible correlación positiva entre abundancia relativa de esta región y un posible efecto supresivo.
- 9.- El papel crítico de la materia orgánica (MO) para sostener la supresividad natural de estos medios no está relacionada con la reserva de celulosa, debido a que la celulosa puede estar protegida por incrustación de lignina no siendo fácilmente disponible para la degradación microbiana.
- 10.- La abundancia relativa de la Hemicelulosa se ha asociado al nivel de supresión de Fusariosis vascular del clavel y del tomate en los medios de crecimiento estudiados.

11.- Los niveles de Hemicelulosa encontrados en estos medios de crecimiento vegetal podrían estar implicados en las densidades poblacionales encontradas de ciertos grupos econutritivos como *Bacillus* spp, actinomicetos oligotrofos y celulolíticos y con las relaciones actinomicetes oligotrofos / *Bacillus* ologotrofos y actinomicetes celulolítico / *Bacillus* celulolíticos.

12.- La evaluación de eficacia en el control de la Fusariosis vascular del tomate de 584 aislados obtenidos de rizosferas supresivas a las fusariosis vasculares del clavel y del tomate llevó a la selección de dos potenciales agentes de control biológico (ACBs): el aislado 305 (un *Fusarium solani*) y el aislado A19 (un *Streptomyces* sp.).

13.- La fusariosis vascular del tomate se redujo y la producción total se mejoró cuando ambos ACBs fueron aplicados independientemente al sustrato de fibra de coco (medio conductivo), registrándose con ambos ACBs severidades equivalentes a la mostrada por el compost de corcho (medio medianamente supresivo).

14.- Respecto a la aplicación de los ACBs en los composts, en el compost de corcho, sólo el aislado A19 mejoró la supresividad de este sustrato registrandose una severidad similar a la mostrada por el compost de orujo de vid (medio altamente supresivo), mientras que ninguno de los dos ACB mejoró la alta supresividad natural del compost de orujo de vid.

15.- La densidad poblacional del aislado 305 fue superior en los sustratos de compost de corcho y fibra de coco a la de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) lo que podría indicar competición entre ambas poblaciones.

16.- Sólo el aislado A19 fue capaz de mejorar la productividad de forma significativa en la fibra de coco inoculada con Fol y en el CC no inoculado con el patógeno, lo que parece indicar cierto efecto promotor del crecimiento en este aislado.

17.- La Verticilosis vascular del algodonero sólo fue reducida por el sustrato de compost de alperujo mientras que a Verticilosis vascular del olivo fue reducida tanto por éste como por el compost de orujo de vid.

18.- Las variables que se correlacionaron positiva y significativamente con el retraso en el inicio de la aparición de síntomas de ambas verticilosis en estos composts fueron el pH y la actividad enzimática  $\beta$ -glucosidasa.

19.- La actividad enzimática fosfatasa alcalina se correlacionó positivamente con el retraso del en el inicio de los síntomas de la Verticilosis del olivo mientras que la tasa de consumo de oxígeno se correlacionó positivamente con el retraso en el inicio de los síntomas de la Verticilosis del algodonero.

20.- Aunque los composts mostraron al final de los bioensayos una menor densidad de microesclerocios de *Verticillium dahliae* respecto a la FC, esto no se relacionó con los niveles de supresividad detectados.

# **BIBLIOGRAFÍA DE INTRODUCCIÓN Y DISCUSIÓN GENERAL**





## BIBLIOGRAFÍA

### A

---

Abad, M. 1991. Los sustratos hortícolas y las técnicas de cultivo sin suelo. En: Rallo, L., Nuez, F. (Eds.). La horticultura española en la C.E.E. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Córdoba, España. pp. 271-280.

Abad, M., Noguera, P., Noguera, V. 1996. Turbas para semilleros. En: II Jornadas Sobre Semillas y Semilleros Hortícolas. Congresos y Jornadas, 35/96. Junta: de Andalucía. Consejerías de Agricultura y Pesca, Sevilla. pp. 79-101.

Abad, M., Noguera, P., Puchades, R., Maquieira, A., Noguera, V. 2002. Physico-chemical and chemical properties of some coconut coir dust for use as a peat substitute for containerised ornamental plants. *Bioresource Technology*. 82: 241-245.

Abad, M., Noguera, P., Carrión, C. 2004. Los sustratos en los cultivos sin suelo. En: Urrestarazu, M. (Ed.). Tratado de cultivo sin suelo. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. pp. 113-158.

Agrios, G.M. 1998. Fitopatología. Uthea. Balderas, México. pp. 838.

Abo-Elyousr, K.A.M., Hashem, M., Ali, E.H. 2009. Integrated control of cotton root rot disease by mixing fungal biocontrol agents and resistance inducers. *Crop Protection*. 28: 295-301.

Adani, F., Genevini, P., Tambone, F., Montoneri, E. 2006. Compost effect on soil humic acid: A NMR study. *Chemosphere* 65: 1414-1418.

Al-Mughrabi, K.I., Aburjai, T.A., Anfoka, G.H., Shahrour, W. 2001. Antifungal activity of olive cake extracts. *Phytopathologia Mediterranea*. 40: 240-244.

Alabouvette, C. 1999. Fusarium wilt suppressive soils: an example of disease-suppressive soils. *Australasian Plant Pathology*. 28: 57-64.

Alabouvette, C., Olivain, C., Steinberg, C. 2006. Biological control of plant disease: the European situation. *European Journal of Plant Pathology*. 114: 329-341.

Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., Steinberg, C. 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *The New Phytologist*. 184: 529-544.

Aloi, C., Baayen, R.P. 1993. Examination of the relationships between vegetative compatibility groups and races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Plant Pathology*. 42: 839-850.

Alström, S. 2001. Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their biocontrol activity against *Verticillium dahliae*. *Journal of Phytopathology*. 149: 57-64.

Alves-Santos, F.M., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J.M., Martín-Domínguez, R., García-Benavides, P., Crespo, M.C., Díaz-Mínguez, J.M., Eslava, A.P. 2002. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathology*. 51: 605-611.

Alves-Santos, F.M., Martínez-Bermejo, D., Rodríguez-Molina, M.C., Diez, J.J. 2007. Cultural characteristics, pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Spain. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 71: 26-32.

Anand, A., Uppalapati, S.R., Ryu, C.M., Allen, S.N., Li Kang, Tang, T., Mysore, K.S. 2008. Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*. 146: 703-715.

Andrés, J.L., Vicente, M.J., Cenis, J.L., Collar, J., Tello, J., Cifuentes, D. 2001. Genetic and pathogenic variation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Spain. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*. 27: 249-257.

Antonopoulos, D.F., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Rafeletos, P., Tjamos, E.C. 2008. Effect of *Paenibacillus alvei*, strain K165, on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta. *Biological Control*. 46: 166–170.

Avilés, M. 1998. El residuo industrial de corcho como sustrato hortícola: su capacidad para regular la expresión de los hongos fitopatógenos del suelo. Tesis Doctoral. Universidad de Almería. España.

Avilés, M., Tello, J. 2001. El compostado de los residuos orgánicos. Su relación con las enfermedades de las plantas. En: Labrador, J., Alfieri, M.A. (Eds.). *Agroecología y desarrollo. Aproximación a los fundamentos agroecológicos para la gestión sustentable de agrosistemas mediterráneos*. Universidad de Extremadura. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp. 185-215.

Avilés, M., Borrero, C., Trillas, M.I. 2011. Review on compost as an inducer of disease suppression in plants grown in soilless culture. En: *Special Issue Compost III - Dynamic Plant, Dynamic Soil*. Global Science Books. 5 (Special Issue 2): 1-11.

## B

---

Baayen, R.P. 1988. *Fusarium* wilt of carnation. Tesis Doctoral. Rijksuniversiteit te Utrecht, Países Bajos.

Baayen, R.P., Elgersma, D.M., Demmink, J.F., Sparnaaij, L.D. 1988. Differences in pathogenesis observed among susceptible interactions of carnation with four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 94: 81-94.

Baayen, R.P., van Dreven, F., Krijger, M.C., Waalwijk, C. 1997. Genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *Fusarium redolens* f. sp. *dianthi*. *European Journal of Plant Pathology*. 103: 395-408.

Bailey, D.J., Duczek, L.J. 1996. Managing cereal diseases under reduced tillage. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 18: 159–167.

Baker, K.F., Cook, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, San Francisco. pp. 433.

Baker, R. 1980. Measures to control Fusarium and Phialophora wilt of carnations. Plant Disease. 64: 743-749.

Baker, R., Chet, I. 1982. Induction of suppressiveness. En: Schneider, R.W. (Ed.). Suppressiveness and plant disease. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp. 35-50.

Baker, R. 1988. Environmental conditions favoring symptom expression. Primer curso internacional sobre patógenos vasculares del clavel. Asocolflores. Noviembre 8- 11 de 1988.

Basu, P.K., Brown, N.J., Crete, R., Gourley, C.O., Johnston, Pepin, H.S., Seaman, W.L. 1976. Yield loss conversion factors for Fusarium root rot of pea. Canadian Plant Disease Survey. 56: 25-32.

Bejarano-Alcázar, J., Blanco-López, M.A., Melero-Vara, J.M., Jiménez-Díaz, R.M., 1996. Etiology, importance and distribution of Verticillium wilt of cotton in southern Spain. Plant Disease. 80: 1223-1238.

Ben-Yephet, Y., Shtienberg, D. 1997. Effects of the host, the pathogen, the environment and their interactions, on Fusarium wilt in carnation. Phytoparasitica. 25: 207-216.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C., 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7: 249-260.

Berg, G., Knappe, C., Ballin, G., Seidel, D. 1994. Biological control of *Verticillium dahliae* by naturally occurring rhizosphere bacteria. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 29: 249-262

Blanco-López, M.A., Jiménez-Díaz, R.M., Caballero, J.M. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of *Verticillium* wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopathologia Mediterranea*. 23: 1–8.

Blanco, M.A. 1996. Micosis vasculares. *Patología Vegetal*. S.E.F. Madrid Tomo II. pp. 913-937.

Boehm, M.J., Wu, T., Stone, A.G., Kraakman, B., Iannotti, D.A. 1997. Cross polarized magic-angle spinning  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization of soil organic matter relative to culturable bacterial species composition and sustained biological control of *Pythium* root rot. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 162-68.

Bogale, M., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., Steenkamp, E.T. 2007. Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades of *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiology Letters*. 271: 27-32.

Bonanomi, G., Giorgi, V., Giovanni, D.S., Neri, D., Scala, F. 2006. Olive mill residues affect saprophytic growth and disease incidence of foliar and soilborne plant fungal pathogens. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 115:194-200.

Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F., 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biology and Biochemistry*. 42: 136-144.

Borrero, C. 2007. Supresividad de sustratos hortícolas formulados con composts de residuos agroindustriales frente a la fusariosis vascular del tomate y del clavel. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. España.

Borrero, C., Trillas, M.I., Ordovás, J., Tello, J.C., Avilés, M., 2004. Predictive factors for the suppression of *Fusarium* wilt of tomato in plant growth media. *Phytopathology* 94: 1094-1101.

Borrero, C., Infantes, M.J., González, E., Tello, J.C., Avilés, M., 2005. Relation between suppressiveness to tomato Fusarium Wilt and microbial populations in different growth media. *Acta Horticulturae* 697: 425-430.

Borrero, C., Ordovás, J., Trillas, M.I., Avilés, M., 2006. Tomato Fusarium wilt suppressiveness. The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities as characterised by Biolog<sup>®</sup>. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 1631-1637.

Borrero, C., Trillas, M.I., Avilés, M., 2009. Carnation Fusarium Wilt suppression in four composts. *European Journal of Plant Pathology*. 123: 425-433.

Brisbane, P.G., Rovira, D. 1988. Mechanism of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by fluorescent pseudomonads. *Plant Pathology*. 37: 104-111.

Brown, F., Pokorny, F. 1975. Physical and chemical properties of media composed of milled pine bark and sand. *Journal American Society Horticultural Science*. 100: 119-121.

Burés, S. 1997. *Sustratos*. Ediciones Aerotécnicas S.L. Madrid, España.

Burnett, J.H. 1984. Aspects of Fusarium genetics. En: Moss, M.O., Smith, J.E. (Eds). *The applied mycology of Fusarium*. Cambridge University Press, New York. EEUU. pp 39-69.

## C

---

Caballero, J. M., Pérez Hernández, J., Blanco López, M. A., Jiménez Díaz, R. M. 1980. Olive, a new host of *Verticillium dahliae* in Spain. In: *Proc. 5th Congr. Mediterr. Phytopathol. Union*. Patras, Grecia. pp. 50.

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

Chen, W., Hadar, Y. 1987. Composting and use of agricultural wastes in container media. En: De Bertoldi, M., Feranti, M.P., L'Hermite, P., Zucconi, F. (Eds.). *Compost: Production, Quality and Use*. Elsevier, New York. EEUU. pp: 71-77.

Chen, W., Hoitink, H.A.J., Madden, L.V. 1988a. Microbial activity and biomass in container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*. 78: 1447-1450.

Chen, Y., Inbar, Y., Hadar, Y. 1988b. Composted agricultural wastes as potting media for ornamental plants. *Soil Science*. 145: 298-303.

Chen, Y., Imbar, Y. 1993. Chemical and spectroscopical analyses of organic matter transformations during composting in relation to compost maturity. En: Hoitink, H.A.J., Keener, H.M. (Eds.). *Science and Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiology and Utilization Aspects*. Renaissance Publications, Worthington, OH, EEUU. pp. 551-600.

Chiocchetti, A., Bernardo, I., Daboussi, M. J., Garibaldi, A., Gullino, L., Langin, T., Migheli, Q. 1999. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation tissue by PCR amplification of transposon insertions. *Phytopathology*. 89:1169-1175.

Civantos, L. 2008. La olivicultura en el mundo y en España. En: Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (Eds.). *El cultivo del olivo*, 6th (Edn.) Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. España. pp: 17-35.

Cobb, G.S., Kever, G.J. 1984. Effects of supplemental N on plant growth in fresh and aged pine bark. *HortScience* 19: 127-129.

Cohen, R., Chefetz, B., Hadar, Y. 1998. Suppression of soil-borne pathogens by composted municipal solid waste. En: Brown, S., Angle, J.S., Jacobs, L. (Eds.). *Beneficial Co-Utilization of Agricultural, Municipal and Industrial By-Products*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos. pp: 113-130 .

Cook, R.J., Bruckart, W.L., Coulson, J.R., Goettel, M.S., Humber, R.A., Lumsden, R.D., Maddox, J.V., McManues, M.L., Moore, L. Meyer, S.F., Quimby, P.C., Stack, J.P., Vaughn, J.L. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. *Biological Control*. 7: 333-351.

Coombs, J.T., Michelsen, P.P., Franco, C.M.M. 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control*. 29: 359-366.

Couteaudier, Y., Tello, J. 1990. Interacciones entre *Fusarium* patógeno y *Fusarium* no patógeno en el suelo y en la rizosfera: Aplicaciones a la lucha biológica contra la fusariosis vascular del tomate. *Cuadernos de Fitopatología*. Especial: 219-222.

Craft, C.M., Nelson, E.B. 1996. Microbial properties of composts that suppress damping-off and root rot of creeping bentgrass caused by *Pythium graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1550-1557.

## D

---

de Bertoldi, M., Vallini, G., Pera, A. Zucconi, F. 1985. Technological aspects of composting including modelling and microbiology. En: Gasser, J.K.R. (Eds.). *Composting of Agricultural and Other Wastes*. Elsevier Applied Science. London y New York. EEUU. pp. 27-41.

De Cal, A. Pascual, S., Melgarejo, P. 1994. Búsqueda de nuevas estrategias para el control de la fusariosis vascular del tomate. *Phytoma*. 61: 14-20.

Dervis, S., Erten, L., Soyulu, S., Tok, F.M., Kurt, S., Yildiz, M., Soyulu, E.M. 2007. Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from olive in western Turkey. *European Journal of Plant Pathology*. 119: 437-447.

Dominguez, J., Negrin, M.A., Rodriguez, C.M. 2001. Aggregate water stability, particle-size and soil solution properties in conducive and suppressive soils to *Fusarium*



wilt of banana from Canary Islands (Spain). *Soil Biology and Biochemistry* 33: 449–455.

Doumbou, C.L., Hamby Salove, M.K., Crawford, D.L., Beaulieu, C. 2002. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*. 82: 85-102.

Duffy, B.K., Ownley, B.H., Weller, D.M., 1997. Soil chemical and physical properties associated with suppression of take-all of wheat by *Trichoderma koningii*. *Phytopathology*. 87: 1118–1124.

Duffy, B.K., Défago, G. 1999. Macro and microelement fertilizers influence the severity of *Fusarium* crown and root rot of tomato in a soilless production system. *Hortscience*. 34: 287-291.

Dukare, A.S., Prasanna, R., Dubey, S.C., Nain, L., Chaudhary, V., Singh, R., Saxena, A.K. 2011. Evaluating novel microbe amended composts as biocontrol agents in tomato. *Crop Protection*. 30: 436-442.

Du, W.S., Du, X.M., Ma, Z.Y. 2002. Progress of Inheritance and Molecular Biology of *Verticillium* wilt resistance in Cotton. *Cotton Science* 5: 311-317.

Duniway, J.M. 1979. Water relations of water molds. *Annual Review of Phytopathology*. 17: 431-460.

Dutta, B.K., 1981. Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control of *Verticillium* wilt. *Plant and Soil*. 63: 209-216.

Dutta, S., Mishra, A.K., Dileep Kumar B.S. 2008. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil biology and biochemistry*. 40: 452-461.

E

---

El-Tarabily, K.A., Soliman, M.H., Nassar, A.H., Al-Hassani, H.A., Sivasithamparam, K., McKenna, F., Ardí, G.E.S.J. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology*. 49: 573-583.

El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K. 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 1505-1520.

El-Zik KM, 1985. Integrated control of *Verticillium* wilt of cotton. *Plant Disease*. 69: 1025–1032.

Elliott, M.L., Des Jardin, E.A., O'Donnell, K., Geiser, D.M., Harrison, N.A., Broschat, T.K. 2010. *Fusarium oxysporum* f. sp. *palmarum*, a novel forma specialis causing a lethal disease of *Syagrus romanzoffiana* and *Washingtonia robusta* in Florida. *Plant Disease*. 94: 31-38.

Erdogan, O., Benlioglu, K. 2010. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biological Control*. 53: 39–45.

Esquinas-Alcázar, J., Nuez, F. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En: Nuez, F. (Ed.). *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundiprensa, Bilbao, España. pp: 13-42.

F

---

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2009)  
<http://www.fao.org/corp/statistics/en/>

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2011)  
<http://www.fao.org/corp/statistics/en/>

Finstein, L., Morris, M. 1975. Microbiology of municipal solid waste composting. *Advances in Applied Microbiology*. 19: 113–151.

Fletcher, J.T., Martin, J.A. 1972. Spread and control Fusarium wilt in carnation. *Plant Pathology*. 25: 81-84.

Forsyth, L.M., Smith, L.J., Aitken, E.A.B. 2006. Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing Fusarium wilt severity. *Mycological Research*. 110: 929-935.

Forte, C., Piazzzi, A., Pizzanelli, S., Certini, G. 2006. CP MAS <sup>13</sup>C spectral editing and relative quantitation of a soil sample. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. 30: 81-88.

Frank, Z.R., Verhaegh, W., Bakker, J.W. 1991. The effect of constant moisture and aeration levels in soil on Fusarium wilt of tomatoes. *Plant and Soil* 136: 231-238.

Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 26: 75-91.

Fravel, D., Olivan, C., Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *Review New Phytologist*. 157: 493-502.

## G

---

Garcés de Granada, E., Orozco de Amézquita, M., Arbeláez G. 1999. Using aryl esterase electrophoresis techniques to distinguish between *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* races. *Acta Horticulturae*. 482: 133-137.

García, A. 2008 Etiología, epidemiología y control no químico de las enfermedades edáficas del cultivo del clavel en invernadero de la costa noroeste de Cádiz. Tesis Doctoral. Universidad de Almería. España.

Garibaldi, A., Pergola, G. 1975. Resistenza di varietà di garofano e di specie di *Dianthus* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (PriU. et Del.) Snyd. et Hans. Annali Istituto Sperimentale per la Floricoltura. 6: 8-16.

Garibaldi, A. 1983. Resistenza di cultivar di garofano nei confronti di otto patotipi di *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Prill. et Del.). Snyd et Hans. Riv. Ortoflorofrutt. Italiana 67:261–270.

Garibaldi, A., Rossi, G. 1987. Osservazioni sulla resistenza del garofano nei confronti del *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Panorama Floricolo. 12: 5-9.

Garibaldi, A., Gullino, M.L. 1987. Fusarium wilt of carnation: present situation, problems and perspectives. Acta Horticulturae. 216: 45-54.

Garibaldi, A. 1975. Race differentiation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Prill et Del.). Snyd. et Hans. First Contribution. Med. Fac. Landbouww. Rijks Univ. Gent. 40: 531–537.

Garibaldi, A. 1977. Race differentiation in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and varietal susceptibility. Acta Horticulturae. 71: 97–101.

Goicoechea, N. 2009. To what extent are soil amendments useful to control Verticillium wilt?. Pest Management Science. 65: 831–839.

Golueke, C.G. 1972. Composting: A study of the process and its principles. Rodale Press, Emmaus, Pa. U.S.A.

Gómez-Lama, C., Valverde-Corredor, A., Pérez-Artés, E. 2012. Molecular analysis of Spanish populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* demonstrates a high genetic diversity and identifies virulence groups in races 1 and 2 of the pathogen. European Journal of Plant Pathology. 132: 561-576.

González-Torres, R., Jiménez-Díaz, R.M., Gómez-Vázquez, J. 1988. Incidencia y distribución de las fusariosis vasculares del melón y de la sandía en Andalucía. *Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetal*. 3: 377-397.

Gorodecki, B., Hadar, Y. 1990. Suppression of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in container media containing composted separated cattle manure and composted grape marc. *Crop Protection*. 9: 271-274.

Griffin, G.J. 1969. *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus flavus* spore germination in the rhizosphere of peanut. *Phytopathology*. 59: 1214-1218.

Gupta, R., Saxena, R.K., Chatuverdi, P., Viridi, J.S. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potencial in fangal cell wall lysis. *Journal of Applied Bacteriology*. 78: 378-383.

## H

---

Hamel, C., Vujanovic, V., Jeannotte, R., Nakano-Hylander, A., St-Arnaud, M. 2005. Negative feedback on a perennial crop: *Fusarium* crown and root rot of asparagus is related to changes in soil microbial community structure. *Plant and Soil*. 268: 75–87.

Hammond, T.E., Cory, D.G., Ritchey, W.M., Morita, H. 1985. High resolution solid state  $^{13}\text{C}$  NMR of Canadian peats. *Fuel*. 64, 1687-1695.

Handreck, K., Black, N. 1991. Growing media for ornamental plants and turf. New South Wales University Press, Kensington, Australia. pp: 401.

Hardy, G.E.S.J., Sivasithamparan, K. 1991a. Effect of sterile and non-sterile leachates extracted from composted Eucalyptus bark and pine-bark container media on *Phytophthora* spp. *Soil Biology and Biochemistry*. 23: 25-30.

Hardy, G.E.S.J., Sivasithamparan, K. 1991b. Sporangial responses do not reflect microbial suppression of *Phytophthora drechsleri* in composted Eucalyptus bark mix. *Soil Biology and Biochemistry*. 23: 757-765.

Hardy, G.E.S.J., Sivasithamparam, K. 1991c. How container media and matric potential affect the production of sporangia, oospores and chlamydospores by three *Phytophthora* species. *Soil Biology and Biochemistry*. 23: 31-39.

Hardy, G.E.S.J., Sivasithamparam, K. 1995. Antagonism of fungi and actinomycetes isolated from composted eucalyptus bark to *Phytophthora drechsleri* in a steamed and non-steamed composted eucalyptus bark amended container medium. *Soil Biology and Biochemistry*. 27: 243-246.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* Species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews*. 2: 43-56.

Hjeljord, L., Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds). *Trichoderma* and *Gliocladium*, vol. 2. Taylor and Francis, Londres, Reino Unido. pp. 131-151.

Hoitink, H.A.J. 1980. Composted bark, a lightweight growth medium with fungicidal properties. *Plant Disease*. 64: 142-147.

Hoitink, H.A.J., Vandoren, Jr., D.M., Schmitthenner, A.F. 1977. Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in a composted hardwood bark potting medium. *Phytopathology*. 67: 561-565.

Hoitink, H.A.J., Kuter, G.A. 1986. Effects of composts in growth media on soilborne pathogens. En: Chen, Y., Avnimelech, Y. (Eds.). *The Role of Organic Matter in Modern Agriculture*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Países Bajos. pp: 289-306.

Hoitink, H.A.J., Fahy, P.C. 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual Review of Phytopathology*. 24: 93-114.

Hoitink, H.A.J., Daughtrey, M., Tayama, H.K. 1987. Control of cyclamen Fusarium wilt. A preliminary report. *Ohio Florist's Association Bulletin*. 693: 1-3.

Hoitink, H.A.J., Inbar, Y., Boehm, M.J. 1991. Status of compost-amended potting mixes naturally suppressive to soilborne diseases of floricultural crops. *Plant Disease*. 75: 869-73.

Hoitink, H.A.J., Inbar, Y., Boehm, M.J. 1993a. Compost can suppress soil-borne diseases in container media. *American Nurseryman*. 178: 91-94.

Hoitink, H.A.J., Boehm, M.J., Hadar, Y. 1993b. Mechanisms of suppression of soilborne plant pathogens in compost-amended substrates. En: Hoitink, H.A.J., Keener, H.M. (Eds.). *Science and Engineering of Composting: Design, Environmental, Microbiological and Utilization Aspects*. Renaissance Publications, Worthington, Ohio, EEUU. pp: 601-621.

Hoitink, H.A.J., Madden, L.V., Boehm, M.J. 1996. Relationships among organic matter decomposition level, microbial species diversity and soilborne disease severity. En: Hall, R. (Ed.). *Principles and practice of managing soilborne plant pathogens*. APS. Press, St. Paul, Minnesota, EEUU. pp. 237-249.

Hoitink, H.A.J., Stone, A.G., Han, D.Y. 1997. Suppression of plant diseases by composts. *HortScience*. 32: 184-187.

Hoitink, H.A.J., Boehm, M.J. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology*. 37: 427-446.

Hoitink, H.A.J., Krause, M.S., Han, D.Y. 2001. Spectrum and mechanisms of plant disease control with composts. En: Stoffela, P.J., Kahn, B.A. (Eds.). *Compost, Utilization in Horticultural Cropping Systems*. Lewis, Boca Raton, Florida, EEUU. pp: 263-273.

Höper, H., Steinberg, C., Alabouvette, C. 1995. Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt of flax. *Soil Biology and Biochemistry*. 27: 955-967.

Höper, H., Alabouvette, C. 1996. Importance of physical and chemical soil properties in the suppressiveness of soils to plant diseases. *European Journal of Soil Biology*. 32: 41–58.

Huber, D.M., Watson, R.D. 1974. Nitrogen form and plant disease. *Annual Review of Phytopathology*. 12: 139-165.

Huber, D.M., Schneider, R.W. 1982. The description and occurrence of suppressive soils. En: Schneider, R.W. (Ed.). *Suppressive soil and plant disease*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, EEUU. pp: 1-8.

## I

---

Iglesias, E., Barral, M.T., Marhuenda, F.C. 2007. Indicadores de la estabilidad y madurez del compost. En: Moreno, J, Moral, R. (Eds.). *Compostaje*. Ediciones Mundiprensa. Madrid, España. pp: 243-283.

Inoko, A., 1982. The composting of organic materials and associated maturity problems. ASPAC, Food & Fertilizer Technology Center, Technical Bulletin nº 71.

Insam, H., de Bertoldi, M. 2003. Microbiology of the composting process. En: Golueke C., Bidlingmaier W., de Bertoldi M., Diaz L. (Eds.). *Compost Science and Technology* Elsevier Science Ltd. pp: 25-48.

## J

---

Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., Steinberg, C. 2007. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators?. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 1-23.

Jiménez-Díaz, R.M., Tjamos, E.C., Cirulli, M. 1998. Verticillium wilt of major tree hosts. Olive. En: Hiemstra, J.A., Harris, D.C. (Eds.). *A compendium of Verticillium wilts in tree species*. Ponsen and Looijen, Wageningen. Países Bajos. pp: 13–16.



Jiménez-Díaz, R.M. 2010. Verticilosis del Olivo. En: Jiménez-Díaz, R.M., Montesinos Seguí, E. (Eds.). Enfermedades de las Plantas Causadas por Hongos y Oomicetos. Naturaleza y Control Integrado. Phytoma-España y SEF, Valencia, España. pp: 225-249.

Jiménez-Díaz, R.M. 1998. Control de enfermedades. En: Jiménez-Díaz, R.M., Lamo de Espinosa, J. (Eds.). Agricultura Sostenible. Agrofuturo, Life, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. pp: 345–375.

Jones, J.P., Woltz, S.S. 1981. Fusarium-incited diseases of tomato and potato and their control. En: Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J. (Eds.). *Fusarium: Diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, EEUU. pp: 157-168.

Jones, J.P., Engelhard, A.W., Woltz, S.S. 1989. Management of Fusarium wilt of vegetables and ornamentals by macro-and microelement nutrition. En: Engelhard, W.A. (Ed.). *Soilborne Plant Pathogens: Management of diseases with macro-and microelements*. American Phytopathological Society Press, St Paul, Minnesota. EEUU. pp: 18-32.

Jordan, V.W.L., Tarr, H.S. 1978. Inoculum suppression of *Verticillium dahliae*. *Annals of Applied Biology*. 89: 139–141

## K

---

Kalc Wright, G.F., Guest, D.I., Wimalajeewa, D.L.S., Van Heeswijck, Y.R. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation in Australia based on pathogenicity, vegetative compatibility and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Assay. *European Journal of Plant Pathology*. 102: 451–457.

Katan, T., Shlevin, E., Katan, J. 1997. Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and aerial dissemination of inoculum. *Phytopathology*. 87: 712-719.

Khan, M.R., Khan S.M. 2001. Biomanagement of Fusarium wilt of tomato by the soil application of certain phosphate-solubilizing microorganisms. *International Journal of Pest Management*. 47: 227-231.

Kim, B.S., Hwang, B. 2007. Microbial fungicides in the control of plant diseases. *Journal of Phytopathology*. 155: 641-653.

Klebanh, H. 1913. Beiträge zur Kenntnis der Fungi Imperfecti I. Eine *Verticillium-Krankheit* auf Dahliaen. *Mycologisches Zentralblatt*. 3: 49-66.

Koch, E, Löffler, I. 2008. Partial characterization of the antimicrobial activity of *Streptomyces antimycoticus* FZB53. *Journal of Phytopathology*. 157: 235-242.

Kotsou, M., Mari, I., Lasaridi, K., Chatzipavlidis, I., Balis, C., Kyriacou, A. 2004. The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology*. 26: 113–121.

Kurle, J.E., Grau, C.R., Oplinger, E.S., Mengistu, A. 2001. Tillage, crop sequence and cultivar effects on Sclerotinia stem rot incidence and yield in soybean. *Agronomy Journal*. 93: 973–982.

Kuter, G.A., Nelson, E.B., Hoitink, H.A.J., Madden, L.V. 1983. Fungal populations in container media amended with composted hardwood bark suppressive and conducive to *Rhizoctonia damping-off*. *Phytopathology*. 73: 1450-1456.

Kwok, O.C.H., Fahy, P.C., Hoitink, H.A.J., Kuter, G.A. 1987. Interactions between bacteria and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia damping-off* in bark compost media. *Phytopathology*. 77: 1206-1212.

## L

---

Langin, T., Capy, P., Daboussy, M.J. 1995. The transposable element Impala, a fungal member of the Tc1-mariner superfamily. *Molecular Genes and Genetics*. 93: 49-59.

- Larkin, R.P., Hopkins, D.L., Martin, F.N. 1993. Ecology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soils suppressive and conducive to Fusarium wilt of watermelon. *Phytopathology*. 83: 1105-1116.
- Larkin, R.P., Fravel, D.R. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. *Plant Disease*. 82: 1022-1028.
- Larkin, R.P., Fravel, D.R. 1999. Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of Fusarium wilt of tomato by non-pathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology*. 89: 1151-1161.
- Larkin, R.P., Fravel, D.R. 2002. Effects of varying environmental conditions on biological control of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology*. 92: 1160–1166.
- Leben, S.D., Wadi, J.A., Easton, G.D. 1987. Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*. 77: 1592–1595
- Levin, A.G., Lavee, S., Tsrur, (Lahkim) L. 2003. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. *Plant Pathology*. 52: 212–218.
- Levin, A.G., Lavee, S., Tsrur, (Lahkim) L. 2007. The influence of salinity on *Verticillium dahliae* in stem cuttings of five olive cultivars. *Journal of Phytopathology*. 155: 587–592.
- Lewis, J.A., Papavizas, G.C. 1991. Biocontrol of plant disease: the approach of tomorrow. *Crop Protection*. 10: 95-105.
- Lima, G., Piedimonte, D., De Curtis, F., Abobaker-Elgelane, A., Nigro, F., D'Onghia, A.M., Alfano, G. and Ranalli, G. 2004. Suppressive effect of composted olive oil by-products towards *Verticillium dahliae* and other fungal pathogens. 5th Int. Symp. on Olive Growing, Izmir, Turkiye, 27 Sept–2 Oct., pp. 64 (Abs).

Lima, G., Piedimonte, D., de Curtis, F., Abobaker Elgelane, A., Nigro, F., D'Onghia, A.M., Alfano, G. Ranalli, G. 2008. Suppressive effect of cured compost from olive oil by-products towards *Verticillium dahliae* and other fungal pathogens. *Acta Horticulturae*. 791: 585-591.

Lockwood, J.L. 1988. Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 26: 93-121.

López-Escudero, F.J., Mwanza, C., Blanco-López, M.A. 2007. Reduction of *Verticillium dahliae* microsclerotia viability in soil by dried plant residues. *Crop Protection*. 26: 127-133.

López-Escudero, F.J., Mercado-Blanco, J. 2011. *Verticillium* wilt of olive: a case of study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant and Soil*. 344: 1-50.

Lori, G., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Alabouvette, C. 2004. Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. *Phytopathology*. 94:661-668.

## M

---

Madi, L., Katan, T., Katan, J., Henis, Y. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology*. 87: 1054–1060.

Magee, C.J. 1931. Steam sterilization of soil with special referring to glasshouses. *Aric. Gaz. N.S. Wales*. 42: 428-432.

Malandraki, I., Tjamos S.E., Pantelides, I.S., Paplomatas, E.J. 2008. Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biological Control*. 44:180-187.

Mandeel, Q., Baker, R. 1991. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81:462-469.

Mandelbaum, R., Hadar, Y. 1990. Effects of available carbon source on microbial activity and suppression of *Pythium aphanidermatum* in composts and peat container media. *Phytopathology*. 80: 794-804.

MARM, 2007. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de estadística 2007: Superficies y Producciones de cultivos. (<http://www.marm.es/es/estadistica/temas/anuario-de-estadistica/default.aspx#para2>).

MARM, 2008. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de estadística 2008: Superficies y Producciones de cultivos. (<http://www.marm.es/es/estadistica/temas/anuario-de-estadistica/default.aspx#para2>).

MARM, 2009. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de estadística 2009: Superficies y Producciones de cultivos. (<http://www.marm.es/es/estadistica/temas/anuario-de-estadistica/default.aspx#para2>).

MARM, 2010. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario de estadística 2010: Superficies y Producciones de cultivos.

Marois, J.J. 1993. Biological control of disease caused by *Fusarium oxysporum*. En: Ploetz, R.C. (Eds.). *Fusarium wilt of banana*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. EEUU. pp: 77-81.

Martin, F.N. 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology*. 41: 325-350.

Mercado-Blanco, J., Rodriguez-Jurado, D., Hervas, A., Jimenez-Diaz, R.M. 2004. Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*. 30: 474-486.

Meschke, H., Schrempf, H. 2010. *Streptomyces lividans* inhibits the proliferation of the fungus *Verticillium dahliae* on seeds and roots of *Arabidopsis thaliana*. *Microbial Biotechnology*. 3: 428–443.

Migheli, Q., Briatore, E., Garibaldi, A. 1998. Use of a random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify races 1, 2, 4 and 8 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Italy. *European Journal of Plant Pathology*. 104:49-57.

Mitteau, Y. 1987. Breeding of new carnations resistant to *Fusarium oxysporum*. *Acta Horticulturae*. 216: 359- 365.

Montoya, J.M. 1988. Los alcornocales. (Ed.) S.E.A. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

Moreno M.T. 1994. Estudio del residuo de la industria del corcho como sustrato hortícola. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla. España.

Moreno, J., Mormeneo, S. 2007. Microbiología y bioquímica del proceso de compostaje. En: Moreno, J, Moral, R. (Eds.). *Compostaje*. Ediciones Mundiprensa. Madrid, España. pp: 111-140.

## N

---

N.C.B.I., National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>).

Nakasaki, K., Sasaki, M., Shoda, M., Kubota, H. 1985. Change in microbial numbers during thermophilic composting of sewage sludge with reference to CO<sub>2</sub> evolution rate. *Applied and Environmental Microbiology*. 49: 37-41.

Nagtzaam, M., Bollen, P.M., Termorshuizen, A.J. 1998. Efficiency of *Talaromyces flavus* alone or in combination with other antagonist in controlling *Verticillium dahliae* in growth chamber experiments. *Journal of Phytopathology*. 146: 165–173.

Narisawa, K., Kawamata, H., Currah, R., Hashiba, T. 2002. Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *European Journal of Plant Pathology*. 108: 103–109.

Nash, S.M., Snyder, W.C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. *Phytopathology*. 52: 567-572.

Navas-Cortés, J., Landa, B.B., Mercado-Blanco, J., Trapero-Casas, J.L., Rodríguez Jurado, D., Jiménez-Díaz, R.M. 2008. Spatiotemporal analysis of spread of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree-density olive orchard in southern Spain. *Phytopathology*. 98: 167-180.

Nelson, E.B., Kutter, G.A., Hoitink, H.A.J. 1983. Effects of fungal antagonists and compost age on suppression of *Rhizoctonia* damping-off in container media amended with composted hardwood bark. *Phytopathology*. 3: 1457-1462.

Nelson, P.E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En: Mace M.E., Bell A.A., Beckman C.C. (Eds.). *Fungal wilt diseases of plants*. Academic Press. New York. EEUU. pp: 51-80.

Noble, R., Roberts, S.J. 2004. Eradication of plant pathogens and nematodes during composting: A review. *Plant Pathology*. 53: 548-568.

Noble, R., Coventry, E. 2005. Suppression of soil-borne plant disease with composts: A review. *Biocontrol Science and Technology*, 15: 3-20.

## O

---

Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L'Haridon, F., Alabouvette, C. 2006. Colonization of tomato roots by pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* together and separately in the soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 1523-1531.

---

P

---

Pane, C., Spaccini, R., Piccolo, A., Scala, F., Bonanomi, G. 2011. Compost amendments enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Biological Control*. 56: 115-124.

Pape, H. 1977. Plagas de las flores y plagas ornamentales. (Eds.) Oikos-tau. Barcelona. España. pp: 656.

Pegg, G.F., Brady, B.L. 2002. *Verticillium* wilts. CAB International, Wallingford.

Pera, J., Calvet, C. 1989. Suppression of *Fusarium* wilt of carnation in a composted pine bark and composted olive pumice. *Plant Disease*. 73: 699-700.

Pérez-Piqueres, A., Edel-Hermann, V., Alabouvette, C., Steinberg, C. 2006. Response of soil microbial communities to compost amendments. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 460-470.

Petit, F., Villegas, F.J. 2004. Cultivo en fibra de coco. En: tratado del cultivo sin suelo. Urrestarazu M. 18: 637-640 pp.

Pizano, M. 2001. Floriculture and the environment. Growing flowers without methyl bromide. UNEP OzonAction website (<http://www.unep.org/ozonaction>).

Prabavathy, V.R., Mathivanan, N., Murugesan, K. 2006. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. *Biological Control*. 39:313-319.

Prados-Ligero, A.M., Basallote-Ureba, M.J., López-Herrera, C.J., Melero-Vara, J.M. 2007. Evaluation of Susceptibility of carnation cultivars to *Fusarium* Wilt and determination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* races in Southwest Spain. *Hortscience*. 42: 596-599.



Prilleux, E., Delacroix, G. 1899. La maladie des oeilletts á Antibes. Comptes Rendís hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences. 129: 744-745.

Poincelot, R.P. 1972. The biochemistry and methodology of composting. Bulletin 727, Conn. Agric. Exp. Stn.

## Q

---

Quecine, M.C., Araujo, W.L., Marcon, J., Azevedo, J.L., Pizzirani-Kleiner A.A. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potencial for biocontrol. Letters in Applied Microbiology. 47: 486-491.

## R

---

Raviv, M., Chen, Y., Inbar, Y. 1986. Peat and peat substitutes as growth media for container-grown plant. En: Chen, Y., Avnimelech, Y. (Eds.). The role of organic matter in modern agriculture. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Países Bajos. pp. 257-276.

Rincón, A.M., Codón, A., Benítez, T. 2008. Hidrolasas y genes fúngicos de interés en biocontrol. En: Pallás, V., Escobar, C., Rodríguez Palenzuela, P., Marcos, J.F. (Eds.). Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología. Mundiprensa, Madrid, España. pp: 345-368.

Rodrigues Almeida, A.M., Ferreira Saraiva, O., Bouças Farias, J.R., Almeida Gaudêncio, C., Torres, E., 2001. Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 36: 1231-1238.

Rodríguez-Jurado, D. 1993. Interacciones huésped parásito en la Verticilosis del olivo (*Olea europaea* L.) inducida por *Verticillium dahliae* Kleb. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. España.

Rodríguez-Kábana, R. 1997. Alternativas no químicas al bromuro de metilo en el control de los patógenos de suelo. Líneas prioritarias de investigación. En: Alternativas al bromuro de metilo en agricultura. Bello, A., González, J.A., Pérez, J., Tello, J.C. Colección: Congresos y Jornadas 44/97. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Almería. pp. 31-32.

Rodríguez-Kábana, R., Clavet, C. 1994. Capacidad del suelo para controlar enfermedades de origen edáfico. *Fitopatologia Brasileira*. 19: 129-138.

Ros, M., Hernandez, M.T., Garcia, C., Bernal, A., Pascual, J.A. 2005. Biopesticide effects of green compost against *Fusarium* wilt on melon plants. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 845-854.

Ruggieri, G. 1946. Una nuova malattia dell'olivo. *L'Italia Agricola* 83: 369-372.

## S

---

Sant, D., Casanova, E., Segarra, G., Avilés, M., Reis, M., Trillas, M.I. 2010. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on *Fusarium* wilt and water usage in carnation grown on compost-based growth medium. *Biological Control*. 53: 291-296.

Schmitthenner, A.F., Canady, C.H. 1983. Role of chemical factors in development of *Phytophthora* diseases. En: Erwin, D.C., Bartnicki-Garcis, S., Tsao, P.H. (Eds.). *Phytophthora: its biology, ecology, taxonomy and pathology*. Amer. Phytopathological Soc., St. Paul, Minnesota, EEUU. pp: 189-196.

Schneider, R.W. 1985. Suppression of *Fusarium* yellows of celery with potassium, chloride, and nitrate. *Phytopathology*. 72: 1567-1573.

Schnathorst, W.C., Sibbett, G.S. 1971. The relation of strains of *Verticillium albo-atrum* to severity of *Verticillium* wilt in *Gossypium hirsutum* and *Olea europaea* in California. *Plant Disease Reporter*. 9: 780-782.

Schnathorst, W.C., Sibbett, G.S. 1971. T-1 *Verticillium* strain: major factor in cotton and olive wilt. *California Agriculture*. 25: 3-5.

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

Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M.A., Oliveira, E., Trillas, I. 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics*. 7: 1-10.

Simpson, M.J., Preston, C.M. 2007. Soil organic matter analysis by solid-state  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. En: Carter, M.R., Gregorich, E.G. (Eds). *Soil Sampling and Methods of Analysis*, 2nd Edition. CRC press, Boca Ratón, Florida, EEUU. pp: 681-692.

Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S., Chung, Y.R. 1999. Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*. 89:92-99.

Singh, B.P., Saikia, R., Yadav, M., Singh, R., Chauhan, V.S., Arora, D.K. 2006. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing wilt of chickpea. *African journal of Biotechnology*. 5: 497-502.

Smith, I.M., Dunez, J., Phillips, D.H., Lelliott, R.A., Archer, S.A. 1992. *Manual de enfermedades de las plantas*. Ediciones Mundi-Prensa, Bilbao, España.

Snyder, W.C., Hansen, H.N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*. 27: 64-67.

Sole-Mauri, F., Illa, J., Magrí, A., Prenafeta-Boldú, F.X., Flotats, X., 2007. An integrated biochemical and physical model for the composting process. *Bioresource Technology*. 98: 3278-3293.

Spencer, S., Benson, D.M. 1982. Pine bark, hardwood bark compost, and peat amendment effects on development of *Phytophthora* spp. and lupine root rot. *Phytopathology*. 72: 346-351.

Stone, A.G., Traina, S.J., Hoitink, H.A.J., 1997. Changes in mass and chemical composition of a composted dairy manure during decomposition to relationship to the collapse of suppression to *Pythium* root rot. *Phytopathology*. 87:S94 (Abstr.).

Suárez-Bonnet, E., López-Herrera, C.J., Melero-Vara, J.M., Prados-Ligero, A.M. 2005. Thermal Inactivation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and its eradication by soil solarization at different depths. *Acta Horticulturae*. 698: 161-166.

## T

---

Tello, J.C., Lacasa, A. 1988. Evolución racial de poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas*. 14: 335-341.

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

Tello, J.C., del Moral, J. 1995. Enfermedades no víricas del tomate. En: Nuez, F. (Ed.). *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. pp: 537-540.

Tello, J.C., Bello, A. 1994. Prácticas ecológicas para una agricultura de calidad. I Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica. pp: 506-516.

Termorshuizen, A.J., van Rijn, E., van der Gaag, D.J., Alabouvette, C., Chen, Y., Lagerlöf, J., Malandrakis, A.A., Paplomatas, E.J., Rämert, B., Ryckeboer, J., Steinberg, C., Zmora-Nahum, S. 2006. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: variability in pathogen response. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 2461–2477.

Thomashow, L.S., Weller, D.M. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites. En:

Stacey, K. (Ed.). Plant-Microbe Interactions Vol. 1. Chapman and Hall, New York, EEUU. pp:187-235

Tjamos, E.C. 1993. Prospects and strategies in controlling *Verticillium* wilt of olive. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 23: 505-512.

Tjamos, E.C., Tsitsigiannis, D.I., Tjamos, S.E., Antoniou, P., Katinakis, P. 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarised soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. European Journal of Plant Pathology. 110: 35-44.

Tjamos, S.E., Fletmetakis, E., Paplomatas, E.J., Katinakis, P. 2005. Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. Molecular Plant Microbe Interactions. 18: 555-561.

Tramier R., Pionnat, C., Metay, C.. 1983. Epidemiology of *Fusarium* wilt during propagation of carnation. Acta Horticulturae. 141: 71-77.

Tramier, R., Antonini, A., Bettachini, A. 1987. Variation of the tolerance level of carnation cultivars against *Fusarium oxysporum dianthi* depending on the substrate. Acta Horticulturae. 216: 105-109.

Trillas, M.I., Avilés, M., Ordovás, J., Bello, A., Tello, J.C. 2002. Using compost as a methyl bromide alternative. BioCycle. 43: 64-68.

Trillas, M.I., Casanova, E., Cotxarrera, L., Ordovás, J., Borrero, C., Avilés, M. 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. Biological Control. 39: 32-38.

Trillas-Gay, M.I., Hoitink, H.A.J., Madden, L.V. 1986. Nature of suppression of *Fusarium* wilt of radish in a container medium amended with composted hardwood bark. Plant Disease. 70: 1023-1027.

Tuitert, G., Szczech, M., Bollen, G.J. 1998. Suppression of *Rhizoctonia solani* in potting mixtures amended with compost made from organic household waste. *Phytopathology*, 88: 764-773.

---

## U

---

Umaerus, V.R., Scholte, K., Turkensteen, L.J., 1989. Crop rotation and the occurrence of fungal diseases in potatoes. En: Vos, J., Van Loon, C.D., Bollen, G.J. (Eds.). *Effects of Crop Rotation on Potato Productions in the Temperate Zones*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos. pp: 171–189.

Uppal, A.K., El Hadrami, A., Adam, L.R., Tenuta, M., Daayf, F. 2008. Biological control of potato wilt under controlled and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts. *Biological Control*. 44: 90–100.

Urrestarazu, M., Salas, M.C. 2004. Los sustratos en los cultivos sin suelo. En: Urrestarazu, M. (Ed.). *Tratado de cultivo sin suelo*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp: 669-699.

---

## V

---

Vasyukova, N.I., Ozeretskovskaya O.L. 2007. Induced plant resistance and salicylic acid: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43: 367-373.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Emilio L. Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Matteo Lorito, M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 1-10.

---

## W

---

Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 26: 379–407.

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

Wilcox, W.F., Miretich, S.M. 1985. Influence of soil water matric potential on the development of *Phytophthora* root and crown rots of mahaleb cherry. *Phytopathology*. 5: 48-653.

Woltz, S.S., Jones, J.P. 1981. Nutritional requirements of *Fusarium oxysporum*: Basis for a disease control system. En: Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Cook, R.J. (Eds.). *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, EEUU. pp: 340-349.

Wilhelm, S. 1955. Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology*. 45: 180–181.

Workneh, F., van Bruggen, A.H.C., Drinkwater, L.E., Shennan, C., 1993. Variables associated with corky root and *Phytophthora* root rot of tomatoes in organic and conventional farms. *Phytopathology*. 83: 581–589.

## X

---

Xia, K., Kinkel, L.L., Samac, D.A. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rot on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biological Control*. 23: 285-295.

## Z

---

Zheng, Y., Xue, Q.Y., Xu, L.L., Xu, Q., Lu, S., Gu, S., Guo, J.H. 2011. A screening strategy of fungal biocontrol agents towards *Verticillium* wilt of cotton. *Biological Control*. 56: 209-216.

Zucconi, F., De Bertoldi, M. 1987. Specifications for solid waste compost. *Byocycle*. May-June. pp. 56-61.