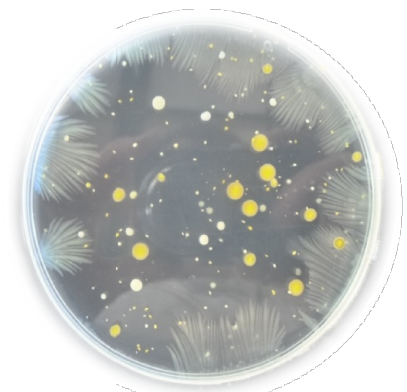
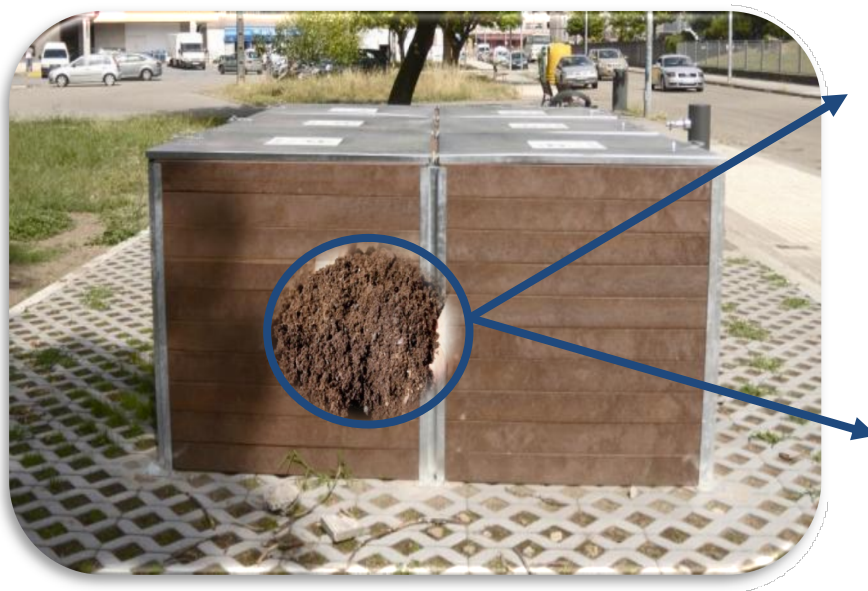


# DetECCIÓN e IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS Y ANTAGONISTAS EN MUESTRAS DE COMPOST

*Detection and identification of phytopathogenic fungi  
and antagonists in compost samples*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Deputación de Pontevedra, quienes, con esfuerzo y dedicación, pusieron en marcha el plan Revitaliza, gracias al cual se ha podido llevar a cabo este proyecto.

Agradecer también a Pedro Mansilla Vázquez, Dr. Ingeniero de Montes, Jefe de Servicio de la Estación Fitopatológica Areeiro (EFA) y a Olga Agúin Casal, Dra. En Ciencias Biológicas, Jefa de Sección de Biología Molecular, por tutorizar este trabajo y por su ayuda y dedicación durante el proceso.

Por último, agradecer a todas aquellas personas que, de una u otra forma, colaboraron en la realización de este trabajo.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVO.....	3
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	3
3.1- Procedencia de las muestras de compost .....	3
3.2- Análisis fitopatológico de hongos y bacterias en muestras de compost .....	3
3.2.1- Detección e identificación de <i>Armillaria</i> sp. y de la especie <i>Rosellinia necatrix</i> .....	4
3.2.2- Aislamiento e identificación del género <i>Fusarium</i> .....	5
3.2.3- Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos y antagonistas.....	6
3.2.4- Aislamiento e identificación de bacterias fitopatógenas y antagonistas.....	7
3.3- Estudio de la capacidad antagonista in vitro de <i>Trichoderma asperellum</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> .....	8
3.4- Evaluación de distintas combinaciones de sustrato y compost en el crecimiento de plantas de <i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i> .....	9
3.4.1- Propiedades del sustrato comercial y del compost utilizado.....	9
3.4.2- Diseño del ensayo.....	9
3.5- Estudio de la capacidad antagonista de <i>Trichoderma asperellum</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de <i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i> creciendo en sustrato y en una mezcla de sustrato y compost.....	10
3.5.1- Preparación de los inóculos.....	10
3.5.2- Diseño del ensayo .....	10
3.6- Análisis estadístico.....	12
4. RESULTADOS.....	12
4.1- Análisis fitopatológico de hongos y bacterias en muestras de compost. ....	12
4.2- Estudio de la capacidad antagonista in vitro de <i>Trichoderma asperellum</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> .....	15
4.3- Evaluación de las distintas mezclas de sustrato y compost en el crecimiento de plantas <i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispa</i> .....	16
4.4- Estudio de la capacidad antagonista de <i>Trichoderma asperellum</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de <i>Lactuca sativa</i> cv. <i>crispa</i> creciendo en sustrato y en una mezcla de sustrato y compost.....	17
5. DISCUSIÓN .....	18
6. CONCLUSIONES .....	23
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24

## 1. INTRODUCCIÓN

La agricultura constituye uno de los pilares fundamentales en la economía mundial y el sustento principal para la vida humana. Por esta razón, la acción de ciertos organismos fitopatógenos sobre las cosechas puede provocar graves problemas, como la baja producción y desarrollo de cultivos o incluso la desaparición de los mismos, lo que supondría graves pérdidas económicas (Juárez-Becerra et al., 2010). Desde hace años, para combatir este tipo de patógenos vegetales y para mejorar la calidad de los suelos, se han utilizado fertilizantes y plaguicidas de carácter químico, causando, en algunos casos, un efecto nocivo importante en el medio ambiente, llegándose a producir contaminaciones en las aguas superficiales, en suelos, pérdidas de biodiversidad microbiana beneficiosa e incluso, la salud animal y humana se han visto afectadas por este tipo de compuestos (FAO, 1997).

Para evitar este tipo de prácticas perjudiciales, desde hace décadas se han estado realizando estudios sobre técnicas agrarias sostenibles y respetuosas con el medio ambiente entre las que se encuentra el compostaje. El compostaje es un proceso, mediante el cual se transforma la materia orgánica, procedente de diversas actividades (agrícolas, domésticas, etc.), en abono de alta calidad (MAGRAMA, 2011). Este proceso se realiza en condiciones aeróbicas, dejando la materia orgánica almacenada en un compostador durante un período prolongado de tiempo y en el que tienen lugar reacciones metabólicas complejas llevadas a cabo por diferentes microorganismos que aprovechan el carbono y el nitrógeno presentes para producir su propia biomasa (MMA, 2011). El proceso de compostaje es, por lo tanto, una actividad que no requiere de muchos cuidados y que se puede realizar siempre que se controlen las condiciones de aireación, humedad y temperatura, mezclando la materia orgánica y añadiéndole agua si fuera preciso. Además, presenta numerosas ventajas tales como: el ahorro en fertilizantes, ya que el compost se produce de forma natural sin necesidad de añadir agentes químicos y el ahorro en la recogida de basuras, puesto que la mayor parte de los residuos orgánicos pueden ser reciclados. De esta forma, se favorece la reducción de la contaminación y se mejora la calidad y la estructura del suelo (Deputación de Pontevedra, 2016).

La transformación de la materia orgánica en compost se suele llevar a cabo en un compostador donde los residuos se almacenan durante un determinado período de tiempo en el que tienen lugar diferentes fases según Laich (2011), y en las que intervienen una gran cantidad de microorganismos:

- *Fase de latencia y crecimiento*: donde se inicia la colonización de los residuos por parte de diferentes microorganismos, los cuales empiezan a degradar la materia orgánica haciendo que aumente la temperatura de la pila de materia



orgánica debido a las reacciones metabólicas que llevan a cabo. Esta fase suele durar entre 4 y 5 días aproximadamente.

- *Fase termófila*: el aumento de la temperatura hace que aparezcan bacterias y hongos termófilos cuya temperatura de acción oscila entre 60 y 70 °C. Durante esta etapa la materia orgánica se degrada rápidamente y se eliminan los organismos patógenos que actúan a temperaturas inferiores. Esta fase puede llegar a durar hasta 2 meses según el grado de descomposición de la materia.
- *Fase de maduración*: donde la temperatura va disminuyendo mientras que la materia orgánica más resistente se va degradando poco a poco. Esta fase puede durar hasta 3 meses en los cuales, las bacterias y hongos mesófilos vuelven a colonizar la pila.

En el compost pueden estar presentes microorganismos que pueden ser perjudiciales para los cultivos. Durante la última década, se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se ha comprobado la presencia de organismos con actividad fitopatógena durante el proceso de compostaje (Ryckeboer et al., 2003; Haruta et al., 2005; Jones et al., 2007; López-González et al., 2013). Algunos ejemplos relevantes son las especies pertenecientes al género *Armillaria* y la especie *Rosellinia necatrix* que afectan principalmente al sistema radicular de plantas superiores causando una podredumbre blanca en el caso de *Armillaria* (Aguín et al., 2008) y podredumbre lanosa en el caso de *Rosellinia necatrix* (Mansilla et al., 2002). Otro género importante es *Fusarium*, en el que se agrupan un gran número de especies con actividad fitopatógena que afectan, sobre todo, al sistema radicular y vascular de plantas hortícolas causando podredumbre de las raíces, marchitamiento foliar y necrosis en zonas del tallo de las plántulas (Sáinz et al., 2012).

Sin embargo, también se ha comprobado que el compost, además de su utilidad como fertilizante natural y como sustento del suelo, puede presentar cierta capacidad biocontroladora frente a distintos microorganismos fitopatógenos, por lo que también sería de utilidad en la lucha contra determinadas enfermedades. Este control viene dado por la actividad antagónica de los microorganismos procedentes del material de partida del compost o de aquellos que colonizan el material compostado durante el proceso (Trillas-Gay et al., 2014). Un ejemplo sería el caso de *Trichoderma* sp., en el que la mayoría de las especies que se agrupan en este género, presentan actividad antagónica frente a multitud de hongos y que gracias a su facilidad para ser aislados y cultivados, a su crecimiento rápido en diferentes sustratos y el hecho de que no afecta a plantas superiores, hacen que este género sea uno de los más estudiados y utilizados para controlar organismos fitopatógenos (Belanger et al., 1995; Jin et al., 1996).

Por todas las razones mencionadas anteriormente, la Diputación de Pontevedra ha promovido, desde principios del año 2016, la implantación de compostadores en varios puntos de la provincia para la producción de compost a partir de residuos orgánicos como por ejemplo restos de comida cruda o cocinada, restos de jardín, posos de café, etc. La finalidad del proceso es obtener un compost de calidad, exento de organismos fitopatógenos y que pueda ser utilizado con garantías como fertilizante o abono natural.

## **2. OBJETIVO**

Con este trabajo se pretende, por un lado conocer los hongos y bacterias fitopatógenas y antagonistas que puedan estar presentes en el compost procedente de la degradación de residuos sólidos urbanos (restos de comida, restos de poda, etc.), elaborado en compostadores situados en la provincia de Pontevedra, y por otro, evaluar el efecto de uno de los compost sobre el crecimiento de plantas hortícolas y en la actividad de *Trichoderma asperellum* y *Fusarium oxysporum*. Por todo ello, los objetivos que se plantearon para este trabajo fueron:

- Conocer la incidencia de hongos fitopatógenos radiculares en muestras de compost.
- Conocer la diversidad de especies del género *Fusarium*.
- Estudiar la presencia de otros hongos y bacterias fitopatógenas y antagonistas.
- Estudiar el efecto de uno de los compost en el crecimiento de plantas de *Lactuca sativa* var. *crispa*.
- Evaluar la capacidad antagonista *in vitro* de *Trichoderma asperellum* frente a *Fusarium oxysporum*.
- Evaluar la capacidad biocontroladora de *Trichoderma asperellum* frente a *Fusarium oxysporum* en plantas de *Lactuca sativa* var. *crispa* en mezcla de sustrato y un compost.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1- Procedencia de las muestras de compost**

Se han utilizado 11 muestras de compost, de las cuales 10 procedían de compostadores pertenecientes a la Diputación de Pontevedra, situados en diferentes localidades de la provincia para la recogida de residuos sólidos urbanos. Las muestras, de aproximadamente dos kilos, fueron recogidas en bolsas de plástico, selladas y debidamente etiquetadas por los maestros compostadores en la fase final de maduración del compost.

La otra muestra, fue recibida directamente en el laboratorio de la Estación Fitopatológica Areiro, procedente de un particular.

### **3.2- Análisis fitopatológico de hongos y bacterias en muestras de compost**

Las muestras de compost se colocaron en bandejas de plástico en el laboratorio y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas para eliminar el exceso de humedad. Los procedimientos utilizados son los que se aplican para la detección de organismos patógenos y antagonistas en los laboratorios de diagnóstico fitopatológico.

### 3.2.1- Detección e identificación de *Armillaria* sp. y de la especie *Rosellinia necatrix*.

Para cada muestra de compost, la extracción de ADN de *Armillaria* y de *Rosellinia necatrix* se llevó a cabo en dos submuestras de 0,5 gramos siguiendo el protocolo del kit comercial Power Soil Extraction (MoBio Laboratories Inc., EEUU), recomendado por el fabricante. En todos los experimentos de PCR, se incluyó un control negativo (muestra de suelo esterilizado) y un control positivo de extracción que consistió en un suelo infectado de forma natural por *Armillaria* y otro control de extracción que consistió en un suelo infectado de forma natural por *Rosellinia*. Al finalizar la extracción, el ADN obtenido se guardó a -20°C hasta su análisis.

Para la detección e identificación de *Armillaria* se amplificó un fragmento del espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr mediante nested-PCR siguiendo el protocolo propuesto por Lochman et al. (2004) con algunas modificaciones establecidas por Escofet et al. (2008). En la primera ronda de PCR, en un tubo de PCR-bead (PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads”, Amersham-Pharmacia) se introdujo 0,3 µl de cada uno de los iniciadores utilizados ITS1 e ITS4 y 1 µl del ADN extraído, completando con agua hasta alcanzar un volumen final de 25 µl.

En la segunda ronda, en un tubo de PCR-bead se añadió 2µl del ADN amplificado en la fase anterior y 1µl de los iniciadores AR1 y AR2, completando con agua hasta obtener un volumen final de 50µl.

La primera amplificación se programó en un termociclador según las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 150 segundos, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 40 segundos, 72°C durante 30 segundos y una elongación final a 72°C durante 5 minutos.

En la segunda amplificación las fases de amplificación fueron las mismas que la primera a excepción del anillamiento de los iniciadores que se realizó a 60°C y la elongación final que fue de 7 minutos.

Los amplicones obtenidos por nested-PCR se separaron por electroforesis a 135 V en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0,5X. Las bandas de ADN se tiñeron con GelRed™ (Biotium Inc, EEUU) y se visualizaron bajo un transiluminador de luz ultravioleta. En cada gel se incorporó un marcador molecular de 100 pares de bases (Nippon Genetics, Germany) para comparar los tamaños de los fragmentos de ADN.

Cuando en alguna de las dos submuestras apareció una banda de amplificación de 868 pb, que por bibliografía se considera positiva para *Armillaria*, se realizó una digestión enzimática según el protocolo de Lochman et al., (2004) utilizando las enzimas de restricción *MboI* o *Hinfl* para la determinación de la especie.

La detección e identificación de *Rosellinia necatrix* a partir de las muestras de compost, se llevó a cabo mediante PCR específica según el protocolo de Schena et al (2003). En cada tubo PCR-bead, se incorporaron 5µl del ADN extraído de compost y se mezclaron

con 1µl de los iniciadores R3 y R8, y se completó con agua hasta alcanzar un volumen de 25µl.

Las condiciones de amplificación fueron las propuestas por Schena et al. (2003): una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos que se componen de una desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, un anillamiento a 60°C durante 30 segundos, una fase de extensión a 72°C durante 1 minuto y una elongación final a 72°C durante 10 minutos

Al igual que en el caso de *Armillaria*, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0,5X. El gel se tiñó con GelRed TM (Biotium Inc, EEUU) y se visualizó bajo un transiluminador de luz ultravioleta.

### **3.2.2- Aislamiento e identificación del género *Fusarium*.**

El análisis de las especies de *Fusarium* presentes en las muestras de compost se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Tello et al. (1991) y Rodríguez-Molina et al. (2001). Las muestras se secaron a temperatura ambiente durante 2-3 días y se tamizaron con un tamiz de 200µ. Se hicieron 4 pesadas de 1 gramo por muestra que se distribuyeron en botes de plástico estériles. De cada bote se sembraron dos placas Petri que contenían 10 ml del medio selectivo Komada (Komada, 1975). Después de la siembra los botes se volvieron a pesar para calcular la cantidad de muestra sembrada. En total por muestra se prepararon 8 placas que se incubaron a 24±2°C en estufa bajo luz fluorescente durante 5-10 días.

Las colonias aisladas se observaron de forma individual al microscopio y se seleccionaron las que presentaban estructuras características del género *Fusarium* (Leslie et al., 2006).

Las colonias seleccionadas se repicaron en medio PDA, se incubaron durante 3 días a 24°C en oscuridad y se estudiaron las características morfológicas y moleculares. En el análisis molecular, la extracción de ADN se llevó a cabo con el kit comercial (E.Z.N.A Fungal DNA Mini Kit), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para la identificación de las distintas especies de *Fusarium*, se realizó una PCR con los primers específicos EF1 y EF2 descritos por Geiser et al. (2004), que amplifican para la región TEF del gen de factor de elongación translacional 1- $\alpha$ , el cual codifica para una región esencial de la maquinaria de proteínas de translación. Para la reacción de amplificación se mezcló en un tubo de PCR-bead, 1µl del producto de extracción con 0,4µl de los primer EF1 y EF2 y se completó con agua hasta alcanzar un volumen de reacción de 25µl. Las muestras se amplificaron en un termociclador programado con los siguientes ciclos: una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos, a continuación 35 ciclos que constan de una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una fase de anillamiento a 53°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 1 minuto y una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Los amplicones obtenidos se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa bajo las mismas condiciones que en los casos anteriores y se observó bajo luz ultravioleta en un transiluminador.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit Illustra ExoProStar 1-Step™ (GE Healthcare Life Sciences, UK). Las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando el Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit bajo las siguientes condiciones 96 °C 1 min, 25 ciclos a 96 °C 10 sec, 50 °C 5 s, y 60°C 4 min. Los productos obtenidos fueron precipitados en etanol y desnaturalizados a 94° durante 3 min y se cargaron en un ABIPrism™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Sequencing Analysis 5.1, y se compararon con secuencias relacionadas de la base de datos NCBI, utilizando el algoritmo Megablast en el programa Blastn para la búsqueda de homologías (Altschul et al., 1990).

Una vez identificadas todas las colonias de *Fusarium* se hizo un conteo del número de colonias por gramo de suelo para cada especie mediante la fórmula descrita por Tello et al. (1991), en la que se divide el número de colonias por placa entre el peso seco del suelo sembrado.

### **3.2.3- Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos y antagonistas.**

Por cada muestra se sembró 1 gramo de compost distribuido en 10 placas Petri con medio de cultivo PDAS (Difco™ agar-patata-dextrosa y estreptomicina). Las placas se sellaron con Parafilm® y se incubaron en estufa a 24°C en oscuridad. Durante una semana, se hizo un seguimiento diario de las placas para comprobar la evolución en el crecimiento. En aquellas placas donde se observaba crecimiento fúngico, los aislados obtenidos se repicaron en PDA para estudiar los caracteres morfológicos y realizar el análisis molecular en caso de que fuese necesario.

Para el estudio morfológico se hicieron preparaciones microscópicas para observar las estructuras fúngicas características de los aislados obtenidos en cultivo (hifas, fiálidas, esporas, clamidosporas, etc.) y se utilizaron claves taxonómicas para su identificación (Barnet et al., 1987; Watanabe, 1994; Leslie et al., 2006).

En aquellos casos en los que la identificación morfológica no fue suficiente para determinar la especie de las colonias encontradas, se analizaron mediante técnicas moleculares. Para ello, la extracción del ADN se realizó a partir del micelio crecido sobre celofán en las placas de PDA mediante el kit comercial E.Z.N.A Fungal DNA Mini Kit (Omega-Biotek) siguiendo el protocolo corto recomendado por el fabricante. Al finalizar la extracción el ADN extraído se guardó a -20°C hasta su análisis.

Se amplificó un fragmento de la región ITS del ADN ribosomal mediante los iniciadores universales ITS1F e ITS4 (White et al, 1990). La amplificación del ADN se hizo en un tubo de PCR-bead al que se le añadió 1µl del ADN extraído, 0,5µl de los iniciadores y agua hasta completar 25 µl. El termociclador se programó con los siguientes ciclos: desnaturalización durante 5 minutos a 96°C, seguido de 30 ciclos a

96°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 90 segundos y finalmente un paso de elongación a 72°C para completar la reacción.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Tras exponer el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador y comprobar la presencia de ADN amplificado, se procedió a la secuenciación.

Para la secuenciación de los productos amplificados se siguió el mismo procedimiento que el explicado en el apartado anterior.

### **3.2.4- Aislamiento e identificación de bacterias fitopatógenas y antagonistas.**

El aislamiento de bacterias a partir de muestras de compost fue realizado en el laboratorio de Bacteriología de la Estación Fitopatológica de Areiro. Para ello, se pesaron 10g de compost y se diluyeron en 100ml de agua destilada. A continuación, se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 1/100, sembrando finalmente, 10µl de la dilución 1/100 en cada uno de los siguientes medios de cultivo generales: LV (levano), NA (agar nutritivo), SNA (medio nutritivo con sacarosa), LPGA (extracto de levadura, bactopectona, glucosa y agar), KB (King's B) e YMA (Agar, extracto de levadura y manitol) y se dejaron incubar a 28°C en oscuridad durante una semana. Finalizado el tiempo de incubación, se seleccionaron aquellas colonias que presentaron morfologías distintas y se sembraron en el medio de cultivo general TSBA (agar con tripticasa y soja), dejándolas crecer en estufa en oscuridad a 28°C durante 24 horas.

Las colonias seleccionadas fueron analizadas por técnicas moleculares. Para ello el ADN se extrajo a partir de las colonias aisladas en TSBA. Se preparó un tubo Eppendorf® para cada aislado de bacterias con 100µl de agua destilada estéril, en los que se diluyeron las colonias bacterianas recogidas con una punta de pipeta. Los tubos se mantuvieron a 95°C durante 10 minutos en un blockheater y a continuación, se introdujeron los tubos en el congelador durante 5 minutos.

Finalizado este proceso, se realizó la amplificación del ADN mediante una PCR, utilizando los primers 13-B y 91-E que amplifican un fragmento de la región 16S del ADN ribosomal (Mignard, 2006). La amplificación del ADN se hizo en un tubo de PCR-bead al que se le añadió 1µl del ADN extraído, 0,5µl de los iniciadores y agua hasta completar 25 µl. El termociclador se programó con los siguientes ciclos: desnaturalización durante 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos a 94°C 1 minuto, 55°C 1 minuto, 72°C durante 2 minutos y finalmente un paso de elongación a 72°C para completar la reacción.

Para verificar la amplificación del ADN de las muestras, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% y se expuso a la luz ultravioleta en un transiluminador. Finalmente, se realizó la secuenciación del ADN amplificado, siguiendo el mismo procedimiento que en los apartados anteriores.

### 3.3- Estudio de la capacidad antagonista in vitro de *Trichoderma asperellum* frente a *Fusarium oxysporum*.

Por la importancia de *Fusarium oxysporum* como agente fitopatógono de cultivos hortícolas y por la capacidad antagonista que presenta *Trichoderma asperellum*, se planteó realizar un ensayo *in vitro* para comprobar el efecto del aislados de *T. asperellum*, obtenido de la muestra 11, frente a dos aislados de *Fusarium oxysporum*, obtenidos de las muestras de compost 1 y 2.

En primer lugar, se realizaron cultivos monospóricos de los aislados seleccionados y se mantuvieron en crecimiento durante 5-7 días en medio PDA en estufa en oscuridad a 24°C. Transcurrido este tiempo, las placas colocaron durante 3 días en una cámara con luz constante para permitir la esporulación de los hongos. A continuación, en una cámara de flujo laminar, se añadieron 5 ml de agua destilada estéril a las placas con los hongos esporulados y con ayuda de un asa Digralsky se raspó la superficie del micelio. Se recogió la solución de esporas de la placa y se pasó a un tubo eppendorf estéril. A partir de esta solución de esporas se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas con PDA. Las placas se observaron al microscopio y se seleccionó una conidia germinada que se colocó en una placa Petri de PDA y se mantuvo en crecimiento durante 7 días.

Se prepararon 50 placas Petri de 90 cm de diámetro con 15 ml de medio PDA. Se hicieron cultivos duales, que consistió en colocar con un sacabocados estéril en un extremo de la placa un disco de agar de aproximadamente 4mm de diámetro que contenía micelio de un aislado de *Fusarium oxysporum* y en el otro extremo de la placa, un disco de las mismas dimensiones con micelio de *Trichoderma asperellum*, con una distancia aproximada de 5 cm entre los discos.

En total, se establecieron 5 tratamientos, con 10 placas para cada uno de ellos, considerando una placa como una repetición. Los tratamientos fueron los siguientes: control *Fusarium oxysporum* 1 (CF1), control *Fusarium oxysporum* 2 (CF2), control *Trichoderma asperellum* (CT), cultivo dual de *Trichoderma asperellum* x *Fusarium oxysporum* 1 (F1xT) y cultivo dual de *Trichoderma asperellum* x *Fusarium oxysporum* 2 (F2xT). Las placas se sellaron con Parafilm y se mantuvieron en estufa en oscuridad a 24°C.

Se realizaron mediciones diarias de los radios de crecimiento de los aislados para evaluar la competencia entre ellos y se calculó a los diez días, momento en el que finalizó el ensayo, el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), con la fórmula utilizada por Ezziyyani et al. (2004) y Suárez et al. (2008):  $PICR = (R1 - R2)/R1 * 100$ , donde R1 es el radio mayor y R2 es el radio.

### **3.4- Evaluación de distintas combinaciones de sustrato y compost en el crecimiento de plantas de *Lactuca sativa* var. *crispa***

Para comprobar el efecto de uno de los compost en el crecimiento de plántulas de *Lactuca sativa* var. *crispa*, cuya semilla, denominada SV 3343, procedía de la empresa Séminis, se llevó a cabo un ensayo con diferentes mezclas de un compost seleccionado y un sustrato comercial. Se escogió este tipo de cultivo, por ser una planta hortícola de rápido crecimiento.

#### **3.4.1- Propiedades del sustrato comercial y del compost utilizado.**

Se utilizó un sustrato comercial fabricado y suministrado por la empresa Costiña Orgánica S.L., que presentó las siguientes características determinadas por el fabricante: 30% de humus 0-15mm de corteza de pino, 20% de humus 3-8mm también de corteza de pino, 20% de fibra de coco, 10% de perlita, 10% de turba y un 10% de corteza de coco. En cuanto a las características químicas el pH fue de 5,8; salinidad comprendida entre 0,8-1,2 mg/l, contenido en nitrógeno de 120-160 mg/l, contenido en fósforo de 130-190 mg/l y contenido en potasio de 160-200 mg/l. Además fue suplementado con abono PG-Mix (14/16/18) de la empresa Yara con un contenido del 14% de nitrógeno, 16% de P<sub>2</sub>O<sub>6</sub> y 18% de K<sub>2</sub>O.

El compost se analizó en el laboratorio de Edafología de la EFA. Se obtuvo un pH en H<sub>2</sub>O (10:50) de 7 y una conductividad eléctrica de 4,30 mS/cm.

#### **3.4.2- Diseño del ensayo.**

Se establecieron diferentes mezclas entre un sustrato comercial y un compost seleccionado (compost 9) para comprobar su efecto sobre el desarrollo de plántulas de *Lactuca sativa* var. *crispa*. Las mezclas que se prepararon fueron las siguientes:

- **Mezcla T1:** 100% de sustrato comercial
- **Mezcla T2:** 75% de sustrato comercial y 25% de compost (3:1)
- **Mezcla T3:** 50% de sustrato comercial y 50% de compost (1:1)
- **Mezcla T4:** 25% sustrato comercial y 75% de compost (1:3)
- **Mezcla T5:** 100% de compost

Por cada una de las mezclas, se establecieron 6 plántulas de lechuga, considerando cada una de ellas como una repetición. Las plantas se colocaron en bandejas de 28 alveolos cada una, siendo las dimensiones de los alveolos de 6,5 cm de ancho por 7 cm de alto. Se mantuvieron en cámara en condiciones controladas de temperatura 25±2°C, humedad relativa del 70% y un fotoperiodo de 12/12 luz /oscuridad.

El ensayo finalizó a los 15 días, momento en el que todas las plántulas de uno de los tratamientos habían muerto. Para el análisis de las muestras, se cortó la parte aérea de cada planta y se secó en estufa a 70°C durante 48 horas para la determinación de su peso seco. Las raíces se separaron del sustrato, se lavaron cuidadosamente para eliminar los restos de sustrato y se secaron de la misma manera que la parte aérea para obtener el peso seco.



### 3.5- Estudio de la capacidad antagonista de *Trichoderma asperellum* frente a *Fusarium oxysporum* en plantas de *Lactuca sativa* var. *crispa* creciendo en sustrato y en una mezcla de sustrato y compost.

Se llevó a cabo un ensayo para comprobar el efecto de *Trichoderma asperellum* y de dos aislados de *Fusarium oxysporum* en plántulas de lechuga, establecidas en un sustrato comercial y en una mezcla de sustrato y el compost 9.

En primer lugar, se prepararon los inóculos de *Fusarium oxysporum* utilizando los cultivos monospóricos de los aislados seleccionados F1 y F2, y el inóculo de *Trichoderma asperellum* también a partir del cultivo monospórico.

#### 3.5.1- Preparación de los inóculos

Para preparar el inóculo de los dos aislados de *Fusarium oxysporum* seleccionados se siguió el método de Gava et al. (2016). Para ello se colocaron 100 gramos de semillas de trigo en cajas de tinción de 10 cm de largo x 8 cm de ancho x 7 cm de altura (**Fig.1**), que se cubrieron con agua destilada durante 5 horas para hidratarlas. Posteriormente, se eliminó el agua y las cajas se esterilizaron en autoclave durante media hora a 121°C.

Las semillas de trigo, una vez esterilizadas, se dejaron enfriar y se sembraron de forma independiente con cada uno de los aislados de *Fusarium oxysporum*. Por cada caja se sembraron 10 fragmentos de 4 mm de diámetro con la ayuda de un sacabocados estéril. Las cajas se sellaron con Parafilm® y se dejaron incubar durante 7 días en oscuridad en una estufa a 25°C.

Para la preparación del inóculo de *Trichoderma asperellum*, se cogió una placa de cultivo monospórico y se añadieron 2 ml de agua destilada estéril en la placa. A continuación, se procedió con el raspado del micelio con la ayuda de un asa Digralsky y se recogieron 2 ml de la solución de esporas. Se midieron en cámara Neubauer y se preparó una solución de  $1,3 \times 10^7$  células. Se utilizaron 50 ml de inóculo por maceta.

#### 3.5.2- Diseño del ensayo

Se utilizaron dos tipos de sustrato para el cultivo de plantas de *Lactuca sativa* var. *crispa*: por un lado, un sustrato comercial y por otro, sustrato comercial mezclado con el compost seleccionado en la proporción utilizada para el tratamiento 4 mencionado anteriormente (3:1). Los sustratos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 1 hora dos días consecutivos.

Se utilizaron bandejas de 28 alveolos cada una, iguales a las del ensayo anterior, en las que se dispusieron dos tratamientos por bandeja, uno en el que las plántulas fueron



**Fig.1:** Caja de tinción con semillas de trigo inoculadas con el aislado *F. oxysporum* 1

sembradas en sustrato comercial y el tratamiento homólogo con las plántulas sembradas en la mezcla de compost y sustrato (**Tabla 1**).

**Tabla 1:** Tratamientos realizados en el ensayo para los diferentes sustratos, incluyendo el código asignado para cada uno de ellos.

Tipo de sustrato	Tratamientos
Sustrato comercial	Control
	<i>Fusarium oxysporum</i> aislado F1
	<i>Fusarium oxyporum</i> aislado F2
Mezcla de compost+sustrato	<i>Trichoderma asperelleum</i> T1
	<i>Fusarium oxysporum</i> x <i>Trichoderma asperellum</i> (F1xT1)
	<i>Fusarium oxysporum</i> x <i>Trichoderma asperellum</i> (F2xT1)

Se prepararon 6 plantas por tratamiento y tipo de sustrato. Las plantas se colocaron en una cámara de cultivo de condiciones ambientales reguladas, temperatura 25°C, humedad del 70% y 12 horas luz/oscuridad). En total se establecieron 72 plantas por cada tratamiento y tipo de sustrato.

En los tratamientos con *Fusarium*, la inoculación se realizó al principio del ensayo, añadiendo 10 g de semillas de trigo con micelio del patógeno. En el caso de los tratamientos con *Trichoderma asperellum*, el inóculo se aplicó al tercer día del ensayo añadiendo a cada planta 50 ml de la solución de esporas preparada.

Se llevó a cabo un seguimiento diario de la evolución de las plantas, observando síntomas asociados a *Fusarium oxysporum*: cambios en las hojas, marchitamiento, etc. Al finalizar el ensayo se estableció un nivel de incidencia de la enfermedad (**Tabla 2**) para cada una de las plantas, donde el nivel 1 hace referencia a plantas sin síntomas, el nivel 2 se asignó a plantas en las que se observó una afectación radicular leve, con pequeñas zonas necrosadas pero sin síntomas en las hojas, el nivel 3, asignado a plantas en las que las raíces presentaron pudrición severa, viéndose afectadas las hojas en las que se observaron colores amarillentos y pérdida de consistencia y, por último, el nivel 4, en el que se determinó la muerte de las plantas (Scott et al., 2010; Scott et al., 2013). Además, se calculó el peso seco de la parte aérea y de la raíz. Para cumplir los postulados de Koch, se hicieron reaislamientos en todas las plantas del ensayo. Para ello se seleccionaron raíces que se desinfectaron en superficie y se sembraron en medio PDA. Los aislados obtenidos se identificaron por las características morfológicas y por técnicas moleculares.

**Tabla 2:** niveles de incidencia de la enfermedad causada por el hongo fitopatógeno en las plantas según Scott et al.,( 2013) y descripción de los síntomas causados por la enfermedad en cada nivel.

Nivel de incidencia	Características de cada nivel
1	Sin síntomas
2	Leve afectación radicular
3	Afectación severa y color amarillento en las hojas
4	Muerte de las plantas

### 3.6- Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa SPSS, con el que se realizó un ANOVA de un factor y un test de Tukey en los casos en los que el ANOVA resultó significativo para comprobar si existen diferencias significativas entre los datos ( $\rho=0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1- Análisis fitopatológico de hongos y bacterias en muestras de compost.

No se ha detectado la presencia de *Armillaria* sp. ni de *Rosellinia necatrix* en ninguna de las muestras de compost analizadas.

En la **Tabla 3** se presentan los resultados obtenidos en el asilamiento e identificación del género *Fusarium*. De las 11 muestras analizadas de compost, se aislaron colonias pertenecientes al género *Fusarium* en 8 de ellas, con un rango de colonias por gramo de compost analizado entre 39 y 1670. En total, se identificaron 3 especies: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Fusarium equiseti*.

*Fusarium oxysporum* fue una de las especies con mayor incidencia, ya que se detectó en seis muestras, presentando valores comprendidos entre 89 y 516 colonias por gramo de compost, seguido de *Fusarium solani*, que fue detectada en tres muestras con valores comprendidos entre 50 y 1670 colonias por gramo de compost y, por último, *Fusarium equiseti*, detectándose en dos muestras de compost en las que se contabilizaron 39 y 67 colonias por gramo.

**Tabla 3:** Especies de *Fusarium* encontradas en las diferentes muestras de compost, incluyendo el número de colonias por gramo de compost.

Nº de muestra	Nº de colonias <i>Fusarium oxysporum</i>	Nº de colonias <i>Fusarium solani</i>	Nº de colonias <i>Fusarium equiseti</i>
1	477	-	-
2	89	-	67
3	189	50	39
4	371	-	-
5	-	-	-
6	-	1670	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	516	-	-
10	-	125	-
11	199	-	-

En los análisis fúngicos realizados, se comprobó la presencia de hongos fitopatógenos, saprófitos y antagonistas. Se han obtenido un total de 62 aislados que se incluyeron en 12 géneros fúngicos distintos. Las especies aisladas que pueden llegar a ser fitopatógenas son *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer* y *Mucor hiemalis*, cuya infección suele tener lugar principalmente en postcosecha. En cuanto a especies con actividad antagonistas, se aislaron tres especies de *Trichoderma* (*T. virens*, *T. hamatum* y *T. asperellum*) y dos de *Penicillium* (*P. glabrum* y *P. chrysogenum*).

También es importante mencionar el caso del género *Mortierella*, del cual se obtuvieron un total de 15 aislados entre los que se encontraron las especies *Mortierella wolfii* y *Mortierella zychae*, siendo la primera, un patógeno que causa enfermedades respiratorias en el ganado bovino. Además, se aislaron especies que podrían causar enfermedades en humanos como las marcadas en negrita en la **Tabla 4**.

**Tabla 4:** Especies fúngicas detectadas con el porcentaje de similitud respecto a las secuencias incluidas en GenBank y el número de aislados encontrados en cada muestra. Las especies marcadas en rojo son aquellas que pueden desarrollar actividad patógena en humanos o animales.

Nº de muestra	Especies aisladas	% de similitud	Nº de aislados detectados
1	<i>Aspergillus nidulans</i>	85	1
	<i>Cephalophora irregularis</i>	96	7
	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	3
	<b><i>Geotrichum candidum</i></b>	95	4
	<b><i>Lichtheimia ramosa</i></b>	97	4
	<i>Mortierella wolfii</i>	98	2
	<i>Neocosmospora ramosa</i>	99	1
2	<b><i>Aspergillus flavus</i></b>	100	1
	<b><i>Lichtheimia corymbifera</i></b>	100	1
3	<b><i>Aspergillus flavus</i></b>	100	1
	<i>Mortierella wolfii</i>	100	1
	<i>Penicillium glabrum</i>	99	1
4	<i>Mortierella wolfii</i>	99	4
	<i>Mucor circinelloides</i>	99	2
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	99	1
5	<i>Mortierella wolfii</i>	93	2
	<i>Neocosmospora ramosa</i>	99	1
6	<i>Mortierella zychae</i>	98	2
	<i>Trichoderma virens</i>	97	1
7	<i>Mucor hiemalis</i>	99	1
	<i>Mucor racemosus</i>	98	2
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	95	2
8	<b><i>Lichtheimia ramosa</i></b>	91	1
	<i>Mortierella wolfii</i>	99	2
	<i>Mucor plumbeus</i>	99	1
	<i>Neocosmospora ramosa</i>	99	1

	<i>Trichoderma hamatum</i>	99	1
9	<b><i>Conidiobolus coronatus</i></b>	99	2
	<i>Rhizopus microsporum</i>	99	2
	<i>Rhizopus oryzae</i>	95	1
	<b><i>Conidiobolus coronatus</i></b>	99	2
10	<b><i>Mortierella wolfii</i></b>	99	2
	<i>Rhizopus microsporus</i>	99	1
	<b><i>Trichoderma asperellum</i></b>	100	1

En todas las muestras de compost se aislaron bacterias y se identificaron un total de 14 géneros diferentes (**Tabla 5**), siendo *Bacillus* el género que apareció con mayor frecuencia y con un total de 8 especies distintas (*B. cereus*, *B. megaterium*, *B. velezensis*, *B. thuringiensis*, *B. siamensis*, *B. subtilis*, *B. flexus* y *B. aryabhatai*). Esta especie se caracteriza por su actividad antagónica frente a hongos, insectos y otras bacterias. En cuanto a las especies con potencial fitopatígeno destaca el género *Pseudomonas* del que se aislaron dos especies (*Pseudomonas migulae* y *Pseudomonas plecoglossicida*).

Además, se detectaron especies con actividad patagénica, tanto para humanos como para animales, que son las que aparecen en la tabla marcadas en rojo.

**Tabla 5:** Especies de bacterias detectadas con el porcentaje de similitud respecto a las secuencias incluidas en el GenBank y el número de aislados encontrados en cada muestra. Las especies marcadas en rojo son aquellas que podrían desarrollar enfermedades en humanos y animales. (\*) Aislados en los que se realizó la identificación por métodos diferentes a la secuenciación.

Nº de muestra	Especies aisladas	% de similitud	Cantidad de especies encontradas
1	<i>Bacillus cereus</i>	*	*
	<b><i>Escherichia fergusonii</i></b>	*	*
	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	*	*
	<b><i>Salmonella entérica</i></b>	*	*
2	<i>Bacillus cereus</i>	99	2
	<i>Paracoccus communis</i>	99	1
	<b><i>Staphylococcus saprophyticus</i></b>	99	1
	<i>Streptomyces badius</i>	99	1
3	<i>Advenella kashmirensis</i>	99	1
	<i>Bacillus cereus</i>	100	2
	<i>Bacillus megaterium</i>	100	1
	<i>Bacillus velezensis</i>	100	1
4	<i>Bacillus cereus</i>	100	1
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	1
	<b><i>Enterobacter cloacae</i></b>	99	1
	<i>Enterobacter ludwigii</i>	100	1
	<b><i>Serratia marcescens</i></b>	100	1
5	<b><i>Enterobacter cloacae</i></b>	100	1
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99	3

6	<i>Bacillus flexus</i>	91	1
	<i>Bacillus siamensis</i>	96	1
	<i>Bacillus subtilis</i>	98	1
	<i>Flavobacterium ginsegisoli</i>	98	1
7	<i>Pantoea vagans</i>	91	1
	<i>Pseudomonas migulae</i>	97	1
8	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	100	1
	<i>Glutamicibacter nicotianae</i>	87	1
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99	2
9	<i>Klebsiella michiganensis</i>	100	1
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99	2
10	<i>Acinetobacter baumannii</i>	93	1
	<i>Bacillus aryabhatai</i>	97	1
	<i>Bacillus subtilis</i>	90	1
	<i>Pantoea ananatis</i>	96	1
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	95	1
11	<i>Bacillus subtilis</i>	*	*

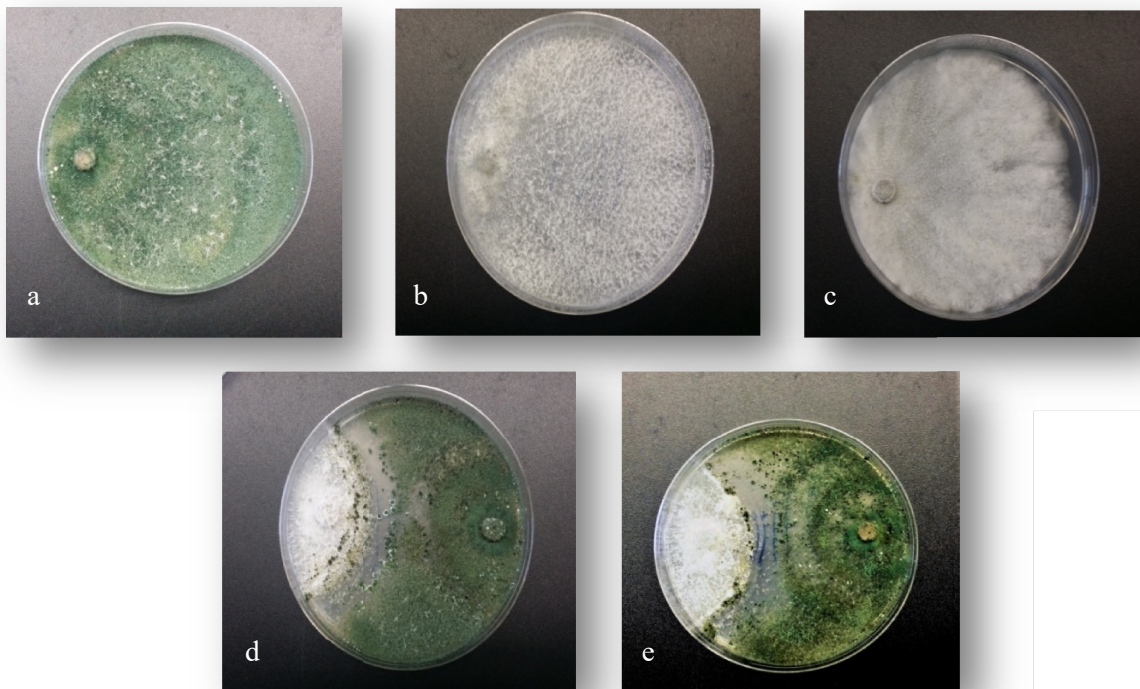
#### 4.2- Estudio de la capacidad antagonista in vitro de *Trichoderma asperellum* frente a *Fusarium oxysporum*.

*Trichoderma asperellum* inhibió el crecimiento *in vitro* de los dos aislados de *Fusarium oxysporum* utilizadas en el ensayo. Si comparamos la media de los radios obtenidos al finalizar el ensayo (**Fig.2**) de los controles F1 y F2 (9,98 cm y 7,68 cm respectivamente), con los obtenidos en los cultivos duales (1,71 cm para F1 y 1,58 cm para F2), se observaron diferencias significativas entre ellos. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los aislados de *Fusarium oxysporum* que crecieron en los cultivos duales, presentando una inhibición del crecimiento similar en ambos casos. Además, se calculó el porcentaje de inhibición que resultó estar comprendido entre el 69-72% (**Tabla 6**).

**Tabla 6:** Crecimiento medio (cm) de las colonias de las especies fúngicas  $\pm$  el error estándar en los diferentes tratamientos y porcentaje de inhibición calculado para cada cultivo dual. Letras distintas, calculadas para cada columna de forma independiente, indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $\rho=0.05$ ) por el test de Tukey.

TRATAMIENTOS	MEDIA CRECIMIENTO <i>T.</i> <i>asperellum</i> día 10 (cm)	MEDIA CRECIMIENTO <i>F. oxysporum</i> día 10 (cm)	% de inhibición
Control <i>T. asperellum</i>	10,39 $\pm$ 0,58 a	-	-
Control <i>F. oxysporum</i> F1	-	9,98 $\pm$ 0,82 a	-
Control <i>F. oxysporum</i> F2	-	7,68 $\pm$ 0,81 a	-
<i>T. asperellum</i> + <i>F. oxysporum</i> 1	5,58 $\pm$ 1,39 b	1,71 $\pm$ 0,66 b	69,30
<i>T. asperellum</i> + <i>F. oxysporum</i> 2	5,58 $\pm$ 1,39 b	1,58 $\pm$ 0,64 b	71,71



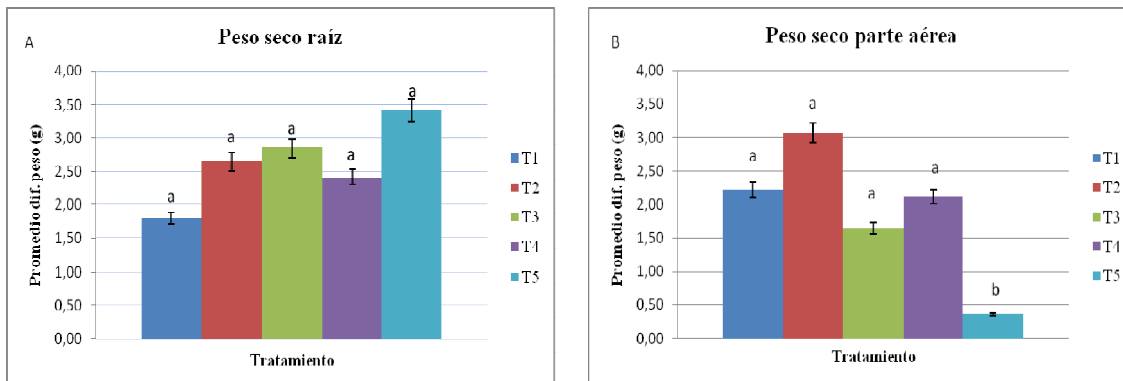


**Fig. 2:** Crecimiento de las colonias fúngicas observadas tras diez días de cultivo en medio PDA de los controles (a: *T. asperellum*,; b: *F. oxysporum* 1; c: *F. oxysporum* 2) y de los cultivos duales (d: *F. oxysporum*1 + *T. asperellum*; e: *F. oxysporum*2 + *T. asperellum*).

#### **4.3- Evaluación de las distintas mezclas de sustrato y compost en el crecimiento de plantas *Lactuca sativa* var. *crispa*.**

Los datos determinaron que a mayores concentraciones de compost, el desarrollo de las plántulas de *Lactuca sativa* cv. *crispa* era menor (**Fig.3**).

En el análisis del peso seco de raíz, no se observaron diferencias significativas entre las mezclas utilizadas, mientras que en el caso del peso de la parte aérea, las mezclas T1 (sustrato 100%), T2 (sustrato 75% - compost 25%), T3 (sustrato 50% - compost 50%) y T4 (sustrato 25% - compost 75%) no mostraron diferencias significativas entre ellos, pero si con el tratamiento 5 (compost 100%), en el que se produjo la muerte de todas las plántulas.



**Fig. 3A y 3B:** Peso seco de raíz (A) y de la parte aérea (B) en plantas de lechuga cultivadas bajo las distintas mezclas (sustrato 100% (T1); sustrato-compost 75-25% (T2); sustrato-compost 50-50% (T3); sustrato-compost 25-75% (T4); compost 100% (T5)). Las barras indican el valor del error estándar. Letras distintas indican que existen diferencias significativas ( $\rho=0,05$ ) entre tratamientos por el test de Tukey.

#### 4.4- Estudio de la capacidad antagonista de *Trichoderma asperellum* frente a *Fusarium oxysporum* en plantas de *Lactuca sativa* cv. *crispa* creciendo en sustrato y en una mezcla de sustrato y compost.

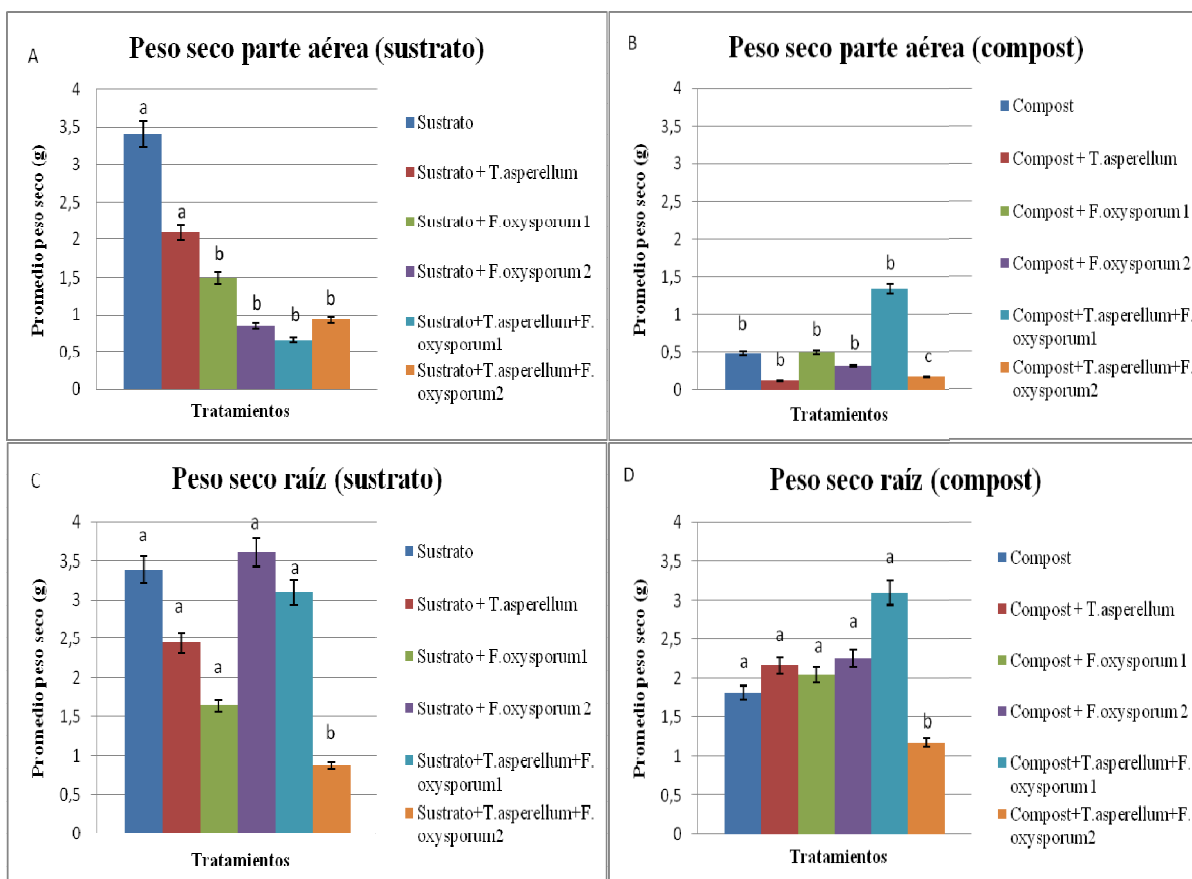
Prácticamente, todas las plantas de lechuga mostraron síntomas de podredumbre causada por *F. oxysporum* (Tabla 7) en todos los tratamientos, tanto en los que se inoculó el aislado F1 como el aislado F2. En aquellas en las que, además del patógeno, se inoculó *Trichoderma asperellum*, también mostraron síntomas de podredumbre, por lo que no hubo evidencias del efecto antagonista.

**Tabla 7:** Promedio del nivel de incidencia asignado a cada una de las plántulas  $\pm$  el error estándar.

Tratamientos	Media del nivel de incidencia
Sustrato+ <i>F.oxysporum</i> 1	3 $\pm$ 0,8
Compost+ <i>F.oxysporum</i> 1	4 $\pm$ 0,4
Sustrato+ <i>F.oxysporum</i> 2	4 $\pm$ 0,4
Compost+ <i>F.oxysporum</i> 2	4 $\pm$ 0
Sustrato+ <i>T.asperellum</i> + <i>F.oxysporum</i> 1	3 $\pm$ 0,5
Compost+ <i>T.asperellum</i> + <i>F.oxysporum</i> 1	4 $\pm$ 0,5
Sustrato+ <i>T.asperellum</i> + <i>F.oxysporum</i> 2	4 $\pm$ 0,5
Compost+ <i>T.asperellum</i> + <i>F.oxysporum</i> 2	4 $\pm$ 0

La diferencia de peso seco y de parte aérea, corrobora que *Trichoderma asperellum* no tuvo ningún efecto en la acción de *F. oxysporum* (Fig.4), ya que no se observan diferencias significativas entre los tratamientos.





**Fig. 4:** Promedio del peso seco calculado para los tratamientos realizados en sustrato (A) y en compost (B), correspondientes a la parte aérea y de los tratamientos realizados en sustrato (C) y en compost (D), correspondientes a la raíz. Las barras de error indican el valor del error estándar y las letras distintas indican diferencias significativas ( $p=0,05$ ) entre los tratamientos estudiados mediante el test de Tukey.

## 5. DISCUSIÓN

### *Análisis fitopatológico de hongos y bacterias en muestras de compost*

La mayoría de las especies europeas pertenecientes al género *Armillaria* y la especie *Rosellinia necatrix* son importantes organismos patógenos a nivel mundial, capaces de infectar el cuello y las raíces de un amplio rango de especies vegetales, causando graves pérdidas económicas (Lochman et al., 2004). Se trata de organismos que tienen un marcado carácter saprófito que les permite sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el suelo sobre material vegetal en descomposición. Por lo tanto, es importante que durante la elaboración del compost, la temperatura y la duración del proceso sea la adecuada para eliminar la actividad de estos hongos. Sería necesario que durante el proceso se alcanzaran temperaturas de 70°C para que *Armillaria* pierda su actividad

(Yuen et al., 1984) y superiores a 35°C para *Rosellinia necatrix* (Ruano-Rosa et al., 2003).

En las muestras de compost analizadas, que pertenecían a la fase final de maduración, no se ha detectado ninguno de estos hongos, lo que es un aspecto favorable de cara a la utilización de estos compost como abono o fertilizante natural en huertos o jardines.

El género *Fusarium* es otro grupo de hongos de gran importancia a nivel mundial por su amplia distribución en el suelo y por incluir especies altamente patógenas en plantas (Leslie et al., 2006). Son organismos filamentosos oportunistas polívoros, que colonizan sobre todo el sistema radicular y vascular de las plantas (Ben-Yephet et al., 1994). Existen algunas especies, incluidas en este género que también pueden afectar a animales y humanos debido a la producción de micotoxinas, siendo más vulnerables aquellas personas con un sistema inmunológico deprimido (Piontelli, 2011). Por lo tanto, al igual que en el caso de *Armillaria* y *Rosellinia necatrix*, es necesario evitar la presencia de especies pertenecientes a este género en el compost.

Una de las especies más importantes desde el punto de vista fitopatológico es *Fusarium oxysporum*. Es un hongo que afecta, sobre todo, al sistema vascular de las plantas, pudriendo las raíces de los cultivos y provocando graves pérdidas económicas (Di Pietro et al., 2001). Además, existen numerosas formas especiales (f.sp.) que pueden presentar diferentes grados de patogenicidad y resistencia (Gordon et al., 1997), lo que dificulta la eficacia de las medidas de control.

Otra de las especies de especial relevancia dentro del género *Fusarium* es *Fusarium solani*. Esta especie también produce la necrosis vascular de plantas hortícolas, afectando en mayor medida a los cultivos de tomate según los estudios llevados a cabo por Wolcan et al. (1991) y Montealegre et al., (2003). Además, resiste temperaturas de hasta 65°C durante un período de 21 días antes de llegar a inactivarse (Bollen et al., 1989).

Por último, la especie *Fusarium equiseti* se encuentra de forma natural en el sistema radicular de la vegetación, produciendo toxinas antifúngicas e insecticidas (Maciá et al., 2009) y en otros casos, micotoxinas que pueden producir enfermedades en animales (Krogh et al., 1989).

De las once muestras analizadas de compost, *Fusarium oxysporum* es la especie que se ha detectado en mayor número con respecto a las otras dos especies. *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* son especies comúnmente encontradas en compost, cuya temperatura necesaria para inhibir su actividad es de 53-65°C (Trillas-Gay et al., 2014).

Muchas de las formas especiales de *Fusarium oxysporum* pueden ser resistentes a temperaturas altas como es, por ejemplo, el caso de *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, que puede resistir temperaturas de hasta 70°C durante un período de tiempo de 75 días antes de perder sus actividades (Hakkou et al., 2011).

Los aislados de *Fusarium* pueden variar en su patogenicidad y puede darse el caso de que las colonias no produzcan efectos nocivos sobre las plantas y que la enfermedad no llegue a producirse. Esto va a depender de diversos factores entre los que se encuentra la propia composición del compost, que puede inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Reuveni et al., 2002).

Que aparezcan este tipo de especies en la fase de maduración de un compost puede indicar que las temperaturas alcanzadas durante el proceso no fueron suficientes para eliminar este tipo de patógenos o que presenten resistencia frente a elevadas temperaturas (Trillas-Gay et al., 2014).

La mayoría de las especies fúngicas detectadas en las muestras de compost, pertenecen a géneros incluidos en la clase Ascomycetes, Sacharomycetes y Zigomycetes, lo que coincide con los estudios llevados a cabo por Ryckeboer et al. (2003). La presencia de estos hongos puede deberse a sus esporas, que sobreviven a la fase termófila durante el proceso de compostaje y pueden volver a colonizar el material compostado durante la fase final del proceso.

En general, los hongos identificados son parte de la flora normal de los suelos y contribuyen de forma activa en el proceso de compostaje, degradando ligninas y celulosas y participando en el proceso de humificación, haciendo que el producto final aumente su valor comercial (Paul y Clark, 1996).

En las muestras, se han detectado especies que en la bibliografía se les atribuye un efecto antagonista de patógenos. Es el caso de hongos pertenecientes a los géneros *Penicillium* o *Trichoderma*, que reducen el desarrollo de *Fusarium oxysporum* según los estudios realizados por Marin et al. (1998) y Gava et al. (2016). Estas especies, además de competir por los nutrientes, generan sustancias antibióticas y antifúngicas que inhiben el desarrollo de otros organismos perjudiciales.

A parte de estos hongos que resultan ser beneficiosos, se detectaron otras especies que, según en la concentración en la que se encuentren, podrían resultar perjudiciales para los cultivos. Un ejemplo es el de *Geotrichum candidum* que produce podredumbre en las raíces de cítricos y vegetales como zanahorias y tomates, afectando sobre todo durante la fase de almacenamiento tras la cosecha (Tournas, 2005; Thorton et al., 2010). También puede infectar a humanos aunque es poco frecuente, ya que forma parte de la microbiota normal del tracto digestivo y afecta sobre todo a personas inmunodeprimidas según los estudios realizados por Henrich et al., 2009.

Algunas de las especies detectadas más llamativas fueron, por ejemplo, *Mortierella wolfii*. Esta especie puede afectar al ganado bovino, provocando una micosis sistémica que afecta principalmente a los pulmones (Berrocal et al., 1995).

Las especies de bacterias aisladas de las muestras de compost coinciden, en su mayoría, con las detectadas en el estudio realizado por Ryckeboer et al., 2003. Son los microorganismos que se encuentran en mayor cantidad durante el proceso de

compostaje debido a su metabolismo rápido y a su facilidad para crecer en condiciones adversas, pudiendo sobrevivir a la fase termófila donde se encuentra el mayor número de colonias.

De las colonias bacterianas obtenidas en las muestras de compost, tienen especial interés los pertenecientes a las especies pertenecientes a los géneros de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* ya que, algunas de sus especies, actúan como antagonistas de ciertos organismos fitopatógenos. Uno de los géneros más estudiados es el de *Bacillus* debido a su amplia distribución, tanto en suelos como en la pila de compostaje, además de que han demostrado su acción antifúngica e insecticida (Sauka et al., 2006; Rosas-García, 2008; Araújo et al., 2005). Concretamente, las especies más utilizadas para formular productos biocontroladores son *Bacillus subtilis* (antifúngico) y *Bacillus thuringiensis* (insecticida). Esto aporta una cierta capacidad biocontrolador frente a determinados hongos como pueden ser algunas especies de *Fusarium* (*Fusarium graminearum*) o frente a insectos lepidópteros perjudiciales para los cultivos. También *Bacillus cereus*, que resultó ser una de las especies más abundantes en el compost analizado, produce un antibiótico (Zwittermicina A) que actúa sobre algunas especies del género *Phytophthora* (oomiceto fitopatógeno) (Trillas-Gay et al., 2014)

También hay que destacar, la presencia de especies que pueden ser patógenas para animales y humanos, como es el caso de *Staphylococcus saprophyticus*, que causa infecciones del tracto urinario (Wallmark et al., 1978), *Escherichia fergusonii*, causante de trastornos diarreicos (Gullian et al., 2011), *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella michiganensis*, que cursan con infección del tracto urinario y neumonías (Knothe et al., 1983; Saha et al., 2012) *Serratia marcescens*, que causa infecciones nosocomiales (Knothe et al., 1983), *Salmonella enterica*, que causa gastroenteritis (Erikson et al., 2002) y *Enterobacter cloacae*, que afecta también al tracto urinario (Andreu, et al., 2011).

### ***Estudio de la capacidad antagonista in vitro de Trichoderma asperellum frente a Fusarium oxysporum***

Los resultados obtenidos *in vitro* muestran que *Trichoderma asperellum* inhibe el crecimiento de los dos aislados de *Fusarium oxysporum*, ya que se alcanzaron porcentajes de inhibición superiores al 50% en los dos casos. Estos resultados tienen relación con los obtenidos en los estudios llevados a cabo por Vargas-Hoyos, (2015) en los que quedó evidenciado el sobrecrecimiento de *Trichoderma* sp. frente a *Fusarium oxysporum* con porcentajes de inhibición superiores al mencionado anteriormente.

En cuanto al porcentaje de inhibición, los valores obtenidos en este estudio son similares a los publicados por Fernández et al., (2009), en cuyo caso los porcentajes no superaron el 65%. Sin embargo, los valores obtenidos en nuestro estudio superaron estos valores, llegando a una tasa comprendida entre el 60-71% de inhibición, por lo que se puede decir que *Trichoderma asperellum* tiene un grado alto de inhibición con

respecto a *Fusarium oxysporum*, siguiendo la clasificación propuesta por los autores mencionados anteriormente.

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma*, son productoras, en su mayoría, de antibióticos y enzimas con capacidad fungicida y antibacteriana. Además, inducen resistencia de las plantas frente a patógenos y son capaces de parasitar los micelio de otras especies fúngicas (micoparasitismo), compitiendo por los nutrientes disponibles e inhibiendo su crecimiento (Harman et al., 2004; Contreras-Cornejo et al., 2016). Por todo ello, el estudio de los mecanismos de inhibición por parte de este género es tan interesante, ya que se pueden utilizar como biocontroladores antifúngico ecológicos, evitando así, el uso de productos químicos que pueden resultar perjudiciales para la salud y el medio ambiente.

#### ***Evaluación de distintas mezclas de compost en el desarrollo de plantas Lactuca sativa cv crispa.***

A los quince días del ensayo, todas las plántulas de *Lactuca sativa* var. crispa, establecidas únicamente en compost murieron. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la supervivencia y desarrollo del resto de las plantas establecidas en las diferentes mezclas de sustrato y compost. Estos resultados son similares a los obtenidos por Eyra et al. (1998) y Costa et al. (2010), los cuales estudiaron el desarrollo de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* var. amarilla de París) en un compost elaborado a partir de algas y restos de pescado, en el que las plántulas de lechuga vieron mermado su crecimiento, debido, principalmente, a la elevada salinidad del compost. En nuestro caso, que las plántulas no se hayan desarrollado bien en compost, podría deberse a varios factores como la salinidad, aunque sería necesario realizar análisis más exhaustivos.

#### ***Estudio de la capacidad antagonista Trichoderma asperellum en el control de Fusarium oxysporum en planta de Lactuca sativa cv rizada creciendo en sustrato y en una mezcla de sustrato y compost.***

Los dos aislados utilizados de *Fusarium oxysporum* mostraron un alto efecto patógeno, ya que en solo diez días, en todos los tratamientos en los que se inocularon los hongos, independientemente del tipo de sustrato usado, todas las plántulas de *Lactuca sativa* cv. crispa murieron. No hubo ningún efecto antagonista *in vivo* de *T. asperellum* sobre *F. oxysporum* aunque, se puede decir, que hubo un aumento de biomasa radicular en presencia del hongo antagonista, lo cual tiene relación con lo obtenido por Donoso et al. (2008). Según esto, *T. asperellum* aumentaría el número de poblaciones en presencia de compost, fomentando, en mayor medida, el crecimiento radicular e inhibiendo de manera más efectiva los posibles patógenos presentes.

Son múltiples, los factores que pueden influir en el éxito de la inhibición de un antagonista sobre un patógeno. Uno de ellos es el momento de la aplicación o cantidad de inóculo de *Trichoderma asperellum*, que, en nuestro caso, fue añadido 3 días después del comienzo del ensayo. Esta diferencia en el tiempo de inoculación, favorecería la

colonización previa del sustrato y probablemente de las raíces de las plántulas *Fusarium oxysporum*, haciendo que la acción de *Trichoderma asperellum* no fuese suficiente para inhibir el patógeno. Esto se explica en el estudio realizado por Cubillo et al., (2011) en el que se llevan a cabo dos inoculaciones de *Trichoderma harzianum*: una, en la que se inoculó un aislado de *Fusarium solani* y, a los cinco días, una suspensión de esporas de *Trichoderma harzianum* y otra, en la que se inoculó *Trichoderma harzianum* en primer lugar y, cinco días después se aplicó el inóculo de *Fusarium solani*, obteniendo mejores porcentajes de inhibición en el último caso.

## 6. CONCLUSIONES

- No se ha detectado la presencia de hongos del género *Armillaria* ni de la especie *Rosellinia necatrix* en ninguno de los compost analizados.
- La identificación en un 80% de las muestras de compost de *Fusarium oxysporum*, una de las especies más importantes del género *Fusarium*, supone un riesgo alto desde el punto de vista fitopatológico para su uso agrícola.
- En el 100% de las muestras analizadas se han detectado una alta diversidad fúngica, la mayoría son hongos saprófitos presentes de manera habitual en suelos, siendo la más relevante *Mortierella* sp., por la cantidad de aislados encontrados. El aislamiento e identificación de especies del género *Trichoderma* sp., podría contribuir al estudio para la inhibición de hongos fitopatógenos.
- En el 100% de las muestras se detectaron especies bacterianas siendo las de mayor incidencia las pertenecientes al género *Bacillus* que se caracterizan por sus propiedades antifúngicas y antibacterianas.
- El aislado de *Trichoderma asperellum*, obtenido de una muestra de compost, tiene capacidad antagonista *in vitro* sobre los dos aislados de *Fusarium oxysporum*, procedentes también de compost, con porcentajes altos de inhibición.
- La viabilidad y desarrollo de plántulas de *Lactuca sativa* cv *crispa* no se vio afectada por las diferentes mezclas entre el sustrato comercial y compost. Sin embargo se produjo una mortalidad del 100% en las plantas establecidas únicamente con compost.
- Los dos aislados de *Fusarium oxysporum* mostraron una alto poder patógeno sobre plantas de *Lactuca sativa* cv *crispa* y no se observó ningún efecto en la inoculación del antagonista *Trichoderma asperellum*.

La elaboración y utilización de compost contribuye a la reducción de residuos urbanos y puede mejorar la estructura de los suelos, pero para garantizar su aplicación en huertos o jardines es necesario realizar más estudios. Es importante conocer la incidencia y diversidad de organismos fitopatógenos que pueden sobrevivir durante el proceso de compostaje y este conocimiento facilitaría la adopción de medidas adecuadas para evitar el desarrollo de estos organismos en la fase final del compost.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguín, O., Mansilla, J. P., Pintos, C., Salinero, C. (1997). *Armillaria mellea* (Vahl:Fries) Kummer Podredumbre blanca. Ficha EFA 02/97.
- Aguín, O., Sáinz, M. J., Pintos, C., Mansilla, J. P. (2002). Posibilidades de control de *Armillaria mellea* en vid. Vida rural – Dossier viña.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Alustrey-Izquierdo, A., Hoffmann, K., Sybren de Hoog, G., Rodríguez-Tudela, J. L., Voigt, K., Bibashi, E., Walther, G. (2010). Species recognition and clinical relevance of the zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia Pro Parte, Mycocladus*). *Journal of Clinical Microbiology*, 2154-2170.
- Andreu, A., Cacho, J., Coira, A., Lepe, J. A. (2011). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29, 52-57.
- Antal, Z., Manczinger, L., Szakacs, G., Tengerdy, R. P., Ferenczy, L. (2000). Colony growth, *in vitro* antagonism and secretion of extracellular enzymes in cold-tolerant strains of *Trichoderma* species. *Mycol. Res.* Vol. 104, 545-549.UK.
- Araújo, F. F., Henning, A. A., Hungria, M. (2005). Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World journal of microbiology and biotechnology* 21, 1639-1645.
- Barnett, H. L., Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*, 4<sup>o</sup> ed. Amer Phytopathological Society.
- Basallote-Ureba, M. J., Vela-Delgado, M. D., Capote, N., Melero-Vara, J. M., López-Herrera, C. J., Prados-Ligero, A. M., Talavera-Rubía, M. F. (2016). Control of *Fusarium* wilt of carnation using organic amendments combined with soil solarization, and report of associated *Fusarium* species in southern Spain. *Crop Protection* Vol 89, 184-192.
- Belanger R, Dufuor N, Caron J & Benhamou N. (1995). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. *Biocontrol Science Technology* 5: 41-54.
- Ben-Yephet, Y., Reuven, M., Szmulewich, Y., Mor, Y. (1994). Effect of methyl bromide on the control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* propagules in carnation greenhouse soil and inoculum increase after one growth cycle of carnation. *Crop Protection* Vol. 13, n<sup>o</sup>5.
- Berrocal, A., D. V. M., Dipl. R. N. V. A., Rodríguez, J., M. Sc., Prendas, J., Gamboa, J. L., Cordero, V. (1995). Micosis sistémica por *Mortierella wolfii* en un bovino. *Comunicaciones Arch. Med. Vet.*, Vol. 27, 2.
- Bollen, G. J., Volver, D., Wijnen, A. P. (1989). Inactivation of soil-borne plant pathogens during small-scale composting of crop residues. *Netherlands Journal Plant Pathology* 95, 19-30.
- Cavalcante, R. S., Lima, H. L. S., Pinto, G. A. S., Gava, C. A. T., Rodrigues, S. (2008). Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bren by solid state fermentation. *Food Bioprocess Technol.* Vol. 1, 100-104.

- Contrearras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, Lourdes, del-Val, E., Larse, J., Muyzer, G. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92.
- Correll, J. C., Klittich, C. J. R., Leslie, J. F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility test. *The American Phytopathological Society* Vol. 77, 1941-1646.
- Costa, P.A., Corral, R., Illera, M., López, E. (2010). Empleo de un compost de algas y restos de pescado como sustrato para la producción de plantas hortícolas. *Recursos Rurais* 6, 89-94.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Mansilla, J. P., Hunter, G. C., Wingfield, M. J. (2004). Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. *Studies in Mycology* Vol.50, 195-204.
- Cubillo, J. G., Páez, A., Mejía, L. (2011). Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. asociado al complejo “secadera “ en maracuyá, bajo condiciones de invernadero. *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín* Vol.64, 5821-5830.
- Di Pletro, A., García-Macelra, F. I., Méglecz, E., Roncero, M. I. G. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 39 (5), 1140-1152.
- Donoso, E., Lobos, G. A., Rojas, N. (2008). Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Bosque* 29, 52-57.
- Eastburn DM, EE Butler. 1988. Microhabitat characterization of *Trichoderma harzianum* in natural soil: Evaluation of factors affecting distribution. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 547-553
- Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Mounier, A., Steinberg, C. (2015). *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach. *Journal of Microbiological Methods* Vol. 111, 64-71.
- Erikson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., Hinton, J. C. D. (2002). Unraveling the biology of macrophage infection by gene expresión profiling of intracelular *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology* 47, 103-118.
- Escobar, N., Mora, J., Romero, N. J. (2012). Identificación de poblaciones microbianas en compost de residuos orgánicos de fincas cafeteras de Cundinamarca. *Boletín científico del centro de museos de historia natural* Vol. 16, 75-88.
- Escofet-Crespo, P., Aguín, O., Sainz, M. J., Mansilla, J. P. (2008). Detección de *Armillaria* mediante técnicas moleculares a partir de muestras de suelo de diferentes especies forestales en Galicia. *Actas de la I reunión científica del grupo de trabajo de sanidad forestal de la sociedad española de ciencias forestales*, 26, 155-160.
- Eyras, M. C., Rostagno, C. M., & Defosse, G. E. (1998). Biological evaluation of seaweed composting. *Compost Science & Utilization*, 6, 4: 74-81.
- Ezziymani, M. (2004). Biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) mediante una combinación de microorganismos antagonistas. Murcia: Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- FAO, 1997. Conservación de los recursos naturales para una agricultura sostenible. Control de plagas y enfermedades,1-13. [http://www.fao.org/ag/ca/Training\\_Materials/CD27-Spanish/pd/pests\\_diseases.pdf](http://www.fao.org/ag/ca/Training_Materials/CD27-Spanish/pd/pests_diseases.pdf).
- FAO, 2013. Manual de compostaje del agricultor, 1-112. <http://www.fao.org/3/a-i3388s.pdf>.



- Fernández, R. J., Suárez, C. L., (2009). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín Vol. 62, 4743-4748.
- Gava, C. A., Pinto, J. M. (2016). Biocontrol of melón wilt caused by *Fusarium oxysporum* Schlect f. sp. *melonis* using seed treatment with spp. and liquid compost. Biological control Vol. 97, 13-20.
- Geiser, D. M., Jimenez, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., O'Donell, K. (2004). Fusarium ID v.1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Eur. J. Plant pathology 110, 473-479.
- Gordon, T. R., Martyn, R. D. (1997). The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Annu. Rev. Phytopathol. Vol.35, 111-128.
- Gullian, M., Durán, J. G., Isla, M. L., Suárez, E., Alarcón, A. (2011). Estudio de factores predisponentes de enfermedad diarreica aguda en la comunidad de San Simón, Yucatán en base a un análisis de vulnerabilidad nutricional y ambiental. Población y salud en Mesoamérica 9, nº1 art.5.
- Harman, G. H., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004). Nature reviews. Microbiology Vol. 2, 43-66.
- Haruta, S., Nakayama, T., Nakamura, K., Hemmi, H., Ishii, M., Igarashi, Y., Nishino, T. (2005). Microbial diversity in biodegradation and reutilization processes garbage. Journal of Bioscience and Bioengineering 99, 1-11.
- Henrich, T.J., Marty, F. M., Milner, D. A., Thorner, A. R. (2009). Disseminated Geotrichum candidum infection in a patient with relapsed acute myelogenous leukemia following allogenic stem cell transplantation and review of the literatura. Transplant infectious disease 11, 458-462.
- Herman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews. Microbiology Vol. 2,43-56.
- Herrera, E., Bacab, I. M., Alejo, J. C., Tun, J. M., Ruíz, E. (2011). Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su control *in vitro*. Fitosanidad Vol. 15, 231-236.
- Jin, X., Taylor, A. G., Harman, G. E. (1996). Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation- tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. Biological control 7, 267-274.
- Jones, D. R., Baker, R. H. A. (2007). Introduction of non-native plant pathogens into Great Britain,1970-2004. Plant pathology 56, 891-910.
- Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E., López-Malo, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos Vol.4, 14-23.
- Karamanlioglu, M., Houlden, A., Robson, G. H. (2014). Isolation and characterisation of fungal communities associated with degradation and growth of the surface of poly(lactic) acid (PLA) in soil and compost. International Biodeterioration and Biodegradation Vol.95, 301-310.
- Knothe, H., Shah, V., Antal, M., Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infections 11, 315-317.

- Komada, H. (1975). Development of a selective médium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soils. Rev. Plant Prot. Res. 8, 114-125.
- Krogh, P., Christensen, D. H., Hald, B., Harlou, B., Larsen, C., Pedersen, E. J., Thirane, U. (1989). Natural occurrence of the mycotoxin Fusarochromanone, a metabolite of *Fusarium equiseti* in cereal feed associated with tibial dyschondroplasia. Applied and Environmental Microbiology 55, 3184-3188.
- Laich, F. (2011). El papel de los microorganismos en el proceso de compostaje. Jornada Técnica: Fertilidad y calidad del suelo. Experiencias de fertilización orgánica en platanera. Proyecto BIOMUSA.
- Lecomte, C., Alabouvette, C., Edel-Herman, V., Robert, F., Steinberg, C. (2016). Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: a review. Biological Control Vol. 101, 17-30.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Ed. Wiley-Blackwell.
- Lochman, J., Omar, S., Mikes, V. (2004). The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR. FEMS Microbiology Letters 237, 105-110.
- López-López, N., Segarra, G., Vergara, O., López-Fabal, A., Trillas, M. I. (2016). Compost from forest cleaning green waste and *Trichoderma asperellum* strain T34 reduced incidence of *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. Biological control Vol. 95, 31-36.
- Maciá, J. G., Rosso, L. C., Ciancio, A., Jansson, H.B., López-Lorca, L. V. (2009). Colonisation of barely roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydsopora*: effects on plant growth and disease. Annals of Applied Biology 155, 391-401.
- Mansilla, J. P., Aguín, O., Salinero, M. C. (2002). First report of a root rot caused by *Rosellinia necatrix* on camelia in Spain. Plant disease. An international Journal of applied plant pathology, 86, 813.
- Markakis, E. A., Fountoulakis, M. S., Daskalakis, G. C., Kokkinis, M., Ligoixgakis, E., K. (2016). The suppressive effect of compost amendments on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumericum* in cucumber and *Verticillium dahliae* in eggplant. Crop Protection Vol. 79, 70-79.
- Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A. J., Vinas, I., Magan, N. (1998). Environmental factors, in vitro interactions and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. Mycological Research 102, 831-837.
- Mbarga, J. B., Martijn, G., Kauté, J., Adiobo, A., Ngonkeu, M. E. L., Ambang, Z., Akoa, A., Tondje, P. R., Begoude, B. A. D. (2012). *Trichoderma asperellum*: a potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. Crop Protection Vol. 36, 18-22.
- Mignard, S., Flandrois, J. P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. J Microbiol Methods 67, 574-581.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2009. Manual de compostaje. Madrid. <http://www.marm.es/es>.
- Montealegre, J., Donoso, S., Herrera, R., Besoain, X. (2003). Identificación de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. como agente causal de la podredumbre del pie de tomate. Boletín Microbiológico Vol. 18, 53-55.
- Nishimura, N. (2007). Selective media for *Fusarium oxysporum*. J. Gen Plant Pathology 73,342-348.
- Paul, E., Clark, F. (1996). Soil Microbiology and Biochemistry. (2° ed.). Academic Press. London, UK.

- Pharand, B., Carisse, O., Benhamou, N. (2002). Cytological aspects of compost-mediated induced resistance against *Fusarium* crown and root rot in tomato. *The American Phytopathological Society* Vol. 92, n° 4, 424-438.
- Piontelli, E. (2011). *Manual de Microhongos filamentosos comunes I*. 1: 261-80.
- Reuveni, R., Raviv, M., Krasnovsky, A., Freiman, L., Medina, S., Bar, A., Orion, D. (2002). Compost induces protection against *Fusarium oxysporum* in sweet basil. *Crop Protection* 21, 583-587.
- Rodríguez-Molina, M. C., Torres-Vila, L. M., Tello, J. C., Blanco, A., Palo, E. J. (2001). Características de las poblaciones de *Fusarium* Link de suelos de dehesas de Badajoz. *Bol. San. Veg. Plagas* 27, 433-437.
- Rosas-García, N. M. (2008). Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base *Bacillus thuringiensis*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. X n° 1, 49-63.
- Ruano-Rosa, D., del Moral-Navarrete, L., López-Herrera, C. J. (2003). Estudio de temperaturas de crecimiento in vitro en aislados de *Trichoderma* sp. y de *Rosellinia necatrix*. Evaluación del antagonismo mediante cultivos duales. *Proceedings V World Avocado Congress*. pp, 525-529.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., Swings, J. (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology* 53, 349-410.
- Saha, R., Farrance, C. E., Verghese, B., Hong, S., Donofrio, R. S. (2013). *Klebsiella michiganensis* sp. nov., a new bacterium isolated from a tooth brush holder. *Curr. Microbiol* 66, 72-78.
- Sainz, M. J., Aguín, O., Bande, M. J., Pintos, C., Mansilla, J. P. (2012). Especies toxigénicas del género *Fusarium* presentes en precosecha de maíz forrajero para ensilado en Galicia. *Actas de la 51ª reunión científica de la SEEP. "Nuevos retos de la ganadería extensiva: un agente de conservación en peligro de extensión"*, 369-375.
- Sanmartín-Negredo, P., López, X., Pemberthy, M. P., Granada-Sinar, D., Rueda-Lorza, E. A. (2012). Análisis del modo de acción y de la capacidad antogónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colleotrichum gloeosporioides* and *Fusarium* sp. *Revista Tumbaga* Vol. 2, 29-49.
- Sauka, D. H., Benintende, G. B. (2006). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Argentina de Microbiología* Vol. 40, 124-140.
- Schena, L., Ippolito, A. (2003). Rapid and sensitive detection of *Rosellinia necatrix* in roots and soils by real time scorpion-PCR. *Journal of plant pathology* 85, 15-25.
- Scott, J. C., Kirkpatrick, S. C., Gordon, T. R. (2010). Variation in susceptibility of lettuce cultivars to fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. *Plant Pathology* Vol. 59, 139-146.
- Scott, J. C., McRoberts, D. N., Gordon, T. R. (2013). Colonization of lettuce cultivars and rotation crops by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*, the cause of fusarium wilt of lettuce. *British Society for Plant Pathology*, 1-5.
- Suárez, C. L., Fernández, R. J., Valero, N. O., Gámez, R. M., Páez, A. R. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. 10 n°2, 35-43.
- Tapia, C., Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Rev. Chilena Infectol* Vol. 31 (1), 85-86.

- Tello, J., Varés, F., Lacas, A. (1991). Pruebas de patogenicidad. Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Thornton, C. R., Slaughter, D. C., Michael Davis, R. (2010). Detection of the sour-rot pathogen *Geotrichum candidum* in tomato fruit and juice by using a highly specific monoclonal antibody-based ELISA. *International Journal of Food Microbiology* Vol. 143, 166-172.
- Tournas, V. H. (2005). Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Critical reviews in Microbiology* 31,33-44.
- Trillas-Gay, M. I., Avilés, M., Suárez-Estrella, F., Moreno, J. (2014). De residuo a recurso: el camino hacia la sostenibilidad. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Vargas-Hoyos, H. A., Gilchrist-Ramell, E. (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología* Vol. 42, 9-16.
- Wallmark, G., Arremark, I., Telander, B. (1978). *Staphylococcus saprophyticus*: a frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients. *The Journal of Infectious Diseases* 138, 791-797.
- Watanabe, T. (1994). Pictorial atlas of soil and seed fungi (3<sup>rd</sup>ed.) CRC Press.
- Wolcan, S. M., Lori, G. A. (1991). Podredumbre del pie de tomate causada por *Fusarium solani*. *Revista Fac. Agronomía* 12, 47-51.
- Yao, Y., Xue, Z., Hong, C., Zhu, F., Chen, X., Wang, W., Cai, Z., Huang, N., Yang, X. (2016). Efficiency of different solarization-based ecological soil treatments on the control of *Fusarium* wilt and their impacts on the soil microbial community. *Applied Soil Ecology* Vol. 108, 341-351.
- Yuen, G. Y., Raabe, R. D. (1984). Effects of small-scale aerobic composting on survival of some fungal plant pathogens. *Plant Disease* 69,134-136.