



Figura 1. Encina afectada por el síndrome de la seca (Solla, A.)

Dulce N. Rodríguez-Navarro*, Natalia Rodríguez-Berbel, María Galiano, Eduardo de la Lastra Alcalde, Carmen Barrau, M^a José Basallote-Ureba y Nieves Capote

IFAPA, Centro Las Torres. Alcalá del Río, Sevilla. dulcenombre.rodriguez@juntadeandalucia.es

Estudios *in vitro* de la capacidad de biocontrol de hongos y oomicetos fitopatógenos por cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*

Debido a la creciente prohibición de la mayoría de los fumigantes y otros agroquímicos para el control de plagas y enfermedades de plantas, es obligada la búsqueda de alternativas más respetuosas con el medio ambiente sin que eso conlleve una reducción de los rendimientos de los cultivos. El empleo de microorganismos como agentes de biocontrol es una práctica agrícola emergente que tendrá una gran implementación en un futuro inmediato, como alternativa al empleo de pesticidas y fungicidas químicos. Los resultados demuestran que mediante el uso de determinadas cepas bacterianas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* es posible un control muy eficaz del desarrollo *in vitro* de determinados agentes patógenos de plantas; como el hongo *Fusarium solani*, patógeno de fresa, o los oomicetos *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium spiculum*, involucrados en la 'seca' de encinas y alcornoques.

Palabras clave: *Fusarium solani*, oomicetos, *Pseudomonas*, *Bacillus*, biocontrol.

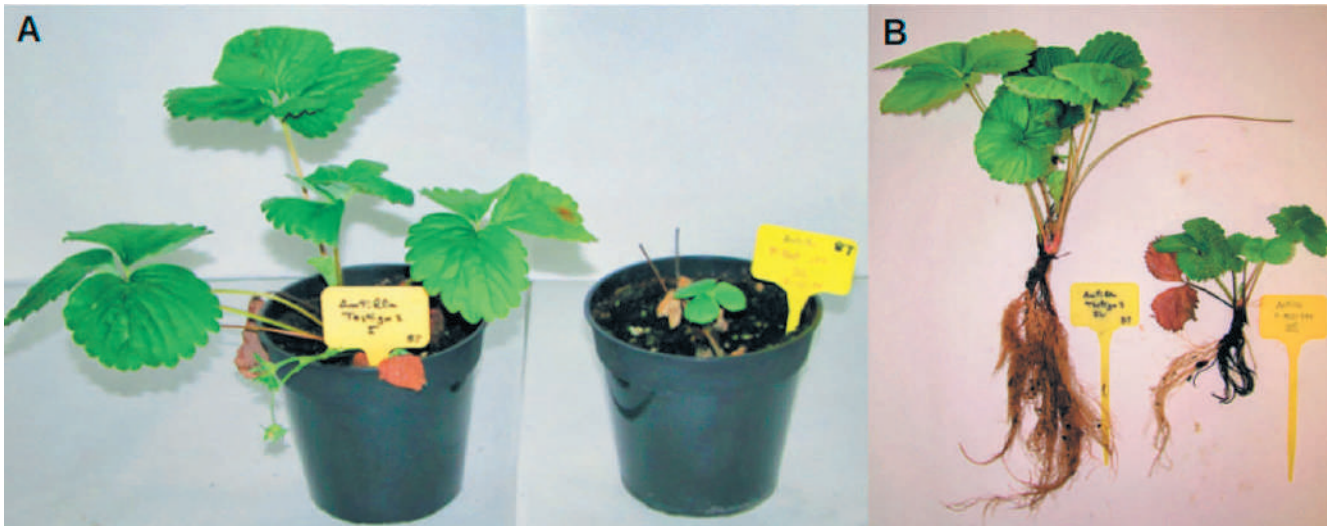


Figura 2. Síntomas de enanismo (A) y escaso desarrollo de raíces (B) en plantas de fresa inoculadas con *Fusarium solani*. A la izquierda se muestran las plantas control sin inocular y a la derecha las plantas inoculadas (Capote, N.)

La necesidad de encontrar prácticas alternativas al control químico en la lucha contra agentes fitopatógenos, ha ido incrementándose en los últimos años, debido a la creciente prohibición de compuestos químicos de síntesis y a una mayor sensibilidad social con respecto al daño medioambiental que éstos ocasionan. Con el objetivo global de la conservación de la salud medioambiental y el específico de mantener la rentabilidad económica de los cultivos, se están introduciendo en la actividad agraria nuevas estrategias de control de las enfermedades. Una de las alternativas más importantes es la utilización de microorganismos rizosféricos, principalmente bacterias y hongos, con probada actividad de biocontrol (Bhattacharyya y Jha, 2012).

El aislamiento de microorganismos antagonistas (bacterias y hongos) de otros patógenos se realiza, en general, a partir de muestras de suelo, suelo rizosférico (la capa de suelo íntimamente ligada a las raíces) u otras fuentes, por ejemplo agua y órganos vegetales (tanto de la filosfera como endófitos). Una vez purificados en el laboratorio, se estudian en ellos determinadas actividades enzimáticas y/o la producción de ciertos metabolitos que permiten clasificarlos como potenciales 'agentes de biocontrol'. Los géneros bacterianos *Bacillus* y *Pseudomonas* destacan por su capacidad de biocontrol (Mardanov y col., 2017; Triverdi y col., 2008).

En muchas ocasiones, un mismo microorganismo con capacidad de biocontrol también puede clasificarse como 'promotor del crecimiento vegetal' debido a otras propiedades, como la producción de hormonas vegetales o la solubilización de fósforo; no obstante, el control de patógenos puede considerarse un mecanismo indirecto de promoción del crecimiento vegetal (Beneduzi y col., 2012).

Tanto el cultivo intensivo de producción de fresa, como el sistema extensivo de dehesa son de gran importancia en Andalucía y se encuentran amenazados por la presencia de hongos y oomicetos patógenos en el suelo. *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. es un hongo de suelo patógeno de más de cien especies de plantas. Se ha descrito como patógeno en las dos fases del cultivo de la fresa en España: en viveros de altura, donde se cultivan las plantas de fresa en suelos al aire libre en condiciones agroclimáticas adecuadas para su desarrollo vegetativo, y en campos de producción de fruto, donde son trasplantadas las plantas procedentes de vivero y tiene lugar su desarrollo y fructificación (Redondo y col., 2012; Pastrana y col., 2014a). Los síntomas provocados por *F. solani* consisten en enanismo, marchitez, necrosis de corona y muerte ocasional de la planta (Figura 2). La emergencia de este patógeno en campos de fresa puede deberse, por un lado,

a la retirada de la mayor parte de las sustancias activas que se utilizaban en el cultivo de la fresa como fumigantes de suelo para combatir las plagas y enfermedades que le afectan (Pastrana y col., 2014b), y por otro, a la gran versatilidad y capacidad adaptativa de *F. solani* que tiene, entre otras características, la capacidad de sobrevivir en suelo en forma de estructuras de resistencia durante largos periodos de tiempo.

Con el término 'seca' se designa comúnmente a una enfermedad que provoca el decaimiento y muerte de las encinas y alcornoques en dehesas y montes. Normalmente se habla de seca en referencia a los síntomas que se observan en la parte aérea de los árboles, ya que la enfermedad provoca la pérdida progresiva de las hojas, con síntomas parecidos a los de la sequía (Figura 1). La mayoría de los expertos coinciden en el origen multifactorial de esta enfermedad (episodios de sequía, contaminación atmosférica o del suelo, manejo inadecuado, agentes biológicos patógenos, etc.) (Duque-Lazo y col., 2018). Entre los agentes biológicos asociados con la seca se han aislado e identificado los oomicetos *Phytophthora cinnamomi* y varias especies de *Pythium*. Además, *P. cinnamomi* ataca a más de mil especies vegetales, entre las que se encuentran muchas especies forestales (castaños, robles y diversas coníferas), así como frutales (aguacates, mangos) y plan-

tas ornamentales (azaleas y brezos). (Zentmyer, 1983).

El objetivo de este estudio ha sido evaluar *in vitro* el efecto de cinco cepas de bacterias rizosféricas (dos pertenecientes al género *Bacillus* y tres a *Pseudomonas*) sobre el control del hongo *F. solani*, patógeno de fresa y de dos oomicetos, *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium spiculum*, asociados a la seca de la dehesa. Para ello, se han llevado a cabo enfrentamientos duales *in vitro* y se ha determinado la tasa de esporulación de *F. solani* en presencia de las cepas bacterianas. Asimismo, se han determinado las actividades enzimáticas de estas cepas: celulasa, β -glucanasa, proteasa, amilasa, quitinasa y producción de ácido cianhídrico (HCN), como actividades determinantes del potencial de biocontrol.

Materiales y Métodos

Microorganismos con acción de biocontrol de patógenos

La descripción de los microorganismos potenciales agentes de control biológico y patógenos empleados se muestra en las Tablas 1 y 2. Se han utilizado dos cepas de *Bacillus* (BPA4 y RBA302) y tres cepas de *Pseudomonas* (RBA83, AMG66 y AMG77) del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla (cedidas por el Prof. J. Olle-ro). Rutinariamente las cepas bacterianas se cultivan en medio agar nutritivo y se preservan a -70°C en una solución peptona-glicerol. Se emplearon dos aislados de *F. solani*: TOR-393 (aislado procedente de planta enferma de una finca de producción de fresa de Palos de la Frontera, Huelva) y TOR-725 (aislado de fresa, procedente de suelo de fincas de producción de fresa de Moguer, Huelva). Los aislados de *Phytophthora cinnamomi* utilizados fueron: CECT2965 (Colección Española de cultivos Tipo), MYC 003 (Centro de Investigación y Ciencias Tecnológicas de Extremadura, CICYTEX) y PE 90 (CICYTEX). El aislado de *Pythium spiculum* fue cedido por la Universidad de Córdoba. Los aislados de *Fusarium* y los oomicetos se mantuvieron rutinariamente en medio APD (Agar-Patata-Dextrosa).

Cepas	Especie	Actividades enzimáticas					
		Celulasa	Proteasa	Lipasa	β -glucosidasa	Amilasa	Ácido cianhídrico (HCN)
BPA4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+++	+++	-	++	++	-
RBA302	<i>Bacillus aryabhatai</i>	-	-	+	-	-	-
RBA83	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	++	+	+++	-	++
AMG66	<i>Pseudomonas sp. (brassicacearum)</i>	-	+	nd	-	-	+++
AMG77	<i>Pseudomonas sp. (fini)</i>	-	+	nd	-	-	+++

Tabla 1. Descripción de las bacterias empleadas y sus actividades metabólicas.

Especie	Aislado	Origen
<i>Fusarium solani</i>	TOR-393	Fresa (Huelva)
<i>Fusarium solani</i>	TOR-725	Suelo (Huelva)
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	CECT2965	Castaño
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	MYC 003	Alcornoque, CICYTEX*
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	PE 90	Encina, CICYTEX
<i>Pythium spiculum</i>	PA 54	Alcornoque, UCO**

(*) Centro de Investigación y Ciencias Tecnológicas de Extremadura

(**) Universidad de Córdoba

Tabla 2. Aislados de *Fusarium solani* y de oomicetos empleados.

Enfrentamientos duales *in vitro* (ensayos de biocontrol)

Se realizaron enfrentamientos duales (hongo u oomiceto vs. bacteria) en placas de Petri conteniendo medio APD. En el centro de la placa se depositó un disco de 5 mm de diámetro del micelio del hongo u oomiceto a ensayar, procedente de una placa de APD de siete días de incubación. A las 48 horas de incubación a 25°C en oscuridad, se depositaron cuatro gotas (15 μl) del cultivo bacteriano (ca 10^8 bacterias/ml) a ensayar (*Bacillus* o *Pseudomonas*), distribuidas en forma radial, a 3 cm de la zona de desarrollo del hongo. La cuantificación del desarrollo del hongo en presencia de la bacteria y en placas control (sin bacterias) se realizó a los tres, cinco, siete y nueve días de incubación. En cada ensayo se incluyeron cinco repeticiones (placas individuales) por tratamiento. Al final del ensayo, se determinó el diámetro de la colonia del hongo u oomiceto (en el caso de que ésta sea circular), o bien del eje mayor y menor, si se trata de un crecimiento romboidal para la estimación del área. Una vez

calculada el área de crecimiento (círculo o rombo), se estimaron los porcentajes de inhibición inducidos por las bacterias, en relación a las placas control, al final del periodo de incubación. Para facilitar la lectura y el seguimiento de los datos, en las Tablas de este trabajo figuran los datos de las áreas de desarrollo de los hongos u oomicetos en presencia de las bacterias a lo largo del tiempo y se calcularon las tasas de crecimiento.

Tasa de esporulación de aislados de *Fusarium solani*

Se tomaron cuatro discos (5 mm de diámetro) de la zona de crecimiento de los aislados de *F. solani* que enfrenta a las bacterias, se colocaron en un tubo de ensayo y se añadieron 5 ml de agua destilada estéril. Los tubos se sonicaron durante 10 min a máxima potencia. En una cámara de Thoma se realizó el recuento total de conidias, por duplicado, en cuatro repeticiones individuales. La concentración medida como conidias/ mm^2 , se estimó tras dividir el conteo total por la superficie de los cuatro discos (Área = $78,54 \text{ mm}^2$).

Determinación de actividades enzimáticas de las cepas bacterianas

Producción de enzimas celulolíticas (Celulasas): como sustrato se empleó carboximetil celulosa (CMC) sódica al 0,5% como única fuente de carbono. Tras sembrar las cepas bacterianas en el medio de cultivo con CMC, las placas se incubaron cinco días a 28°C. Las placas se revelaron, tras su inundación, con una solución de Rojo Congo (1 mg/ml) durante quince minutos. Pasado este tiempo, se eliminó el colorante y se inundó la placa con NaCl 1 M durante quince minutos. Tras eliminar la solución de NaCl, la aparición de un halo de color claro alrededor del crecimiento, correspondiente al halo de degradación, indica que la prueba es positiva (Teather y Wood, 1982) (Figura 3A).

Producción de enzimas β -Glucosidasas: se empleó el medio agar LB + 0,1% esculina + 0,05% de Citrato de hierro amónico. Se sembró una gota de 10 μ L de un cultivo fresco de la cepa a ensayar en una placa. Se incubaron las placas a 30°C durante 24 h o hasta que se observó crecimiento. Las cepas en las que se observa la aparición de un halo negro, debido a la formación de esculetina con los iones Fe presentes en el medio de cultivo, se consideran positivas para β -glucosidasa (Gong y col., 2012).

Producción de enzimas Proteasas/Peptidasas: la capacidad para hidrolizar la caseína se determinó de acuerdo con la metodología descrita en el manual de Harley y Prescott (2002). Las cepas se sembraron en el medio

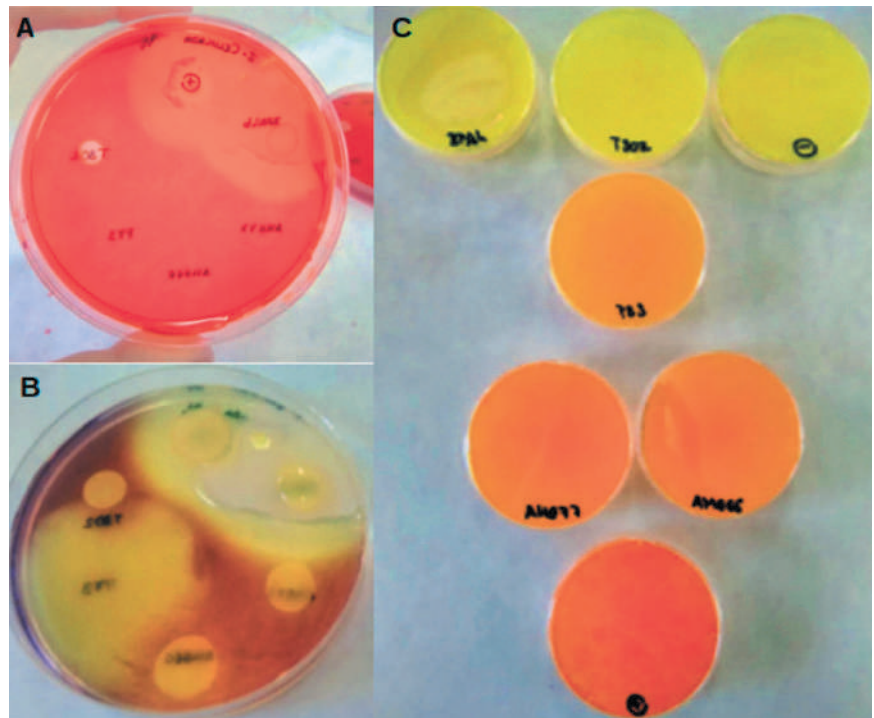


Figura 3. Determinación de la actividad enzimática de las bacterias. (A) Producción de celulasa; (B) Producción de amilasa; (C) Producción de ácido cianhídrico (Rodríguez-Berbel, N.).

agar-caseína. Las placas se incubaron cinco días a 28°C. Esta prueba es de lectura directa, la hidrólisis de la caseína provoca la aparición de halos transparentes alrededor de la zona de crecimiento bacteriano, que contrasta con el medio de cultivo de color blanco.

Producción de enzimas Amilasas: se realizó en placas de medio agar NB (0,8 %) + 1% almidón soluble. Se sembró una alícuota de 15 μ L de un cultivo fresco de cada bacteria. Las placas se incubaron a 28°C du-

rante un periodo de tres a siete días. Transcurrido este tiempo, las placas se inundaron con una solución de Lugol. Se considera como resultado positivo, la aparición de un halo alrededor de la colonia (Cowan y Steel, 1965) (Figura 3b).

Producción de enzimas Quitinasas: las cepas bacterianas se sembraron e incubaron a 28°C durante siete días en placas con medio mínimo suplementado con quitina coloidal; la formación de un halo transparente de degradación, alrededor de la zona de cre-

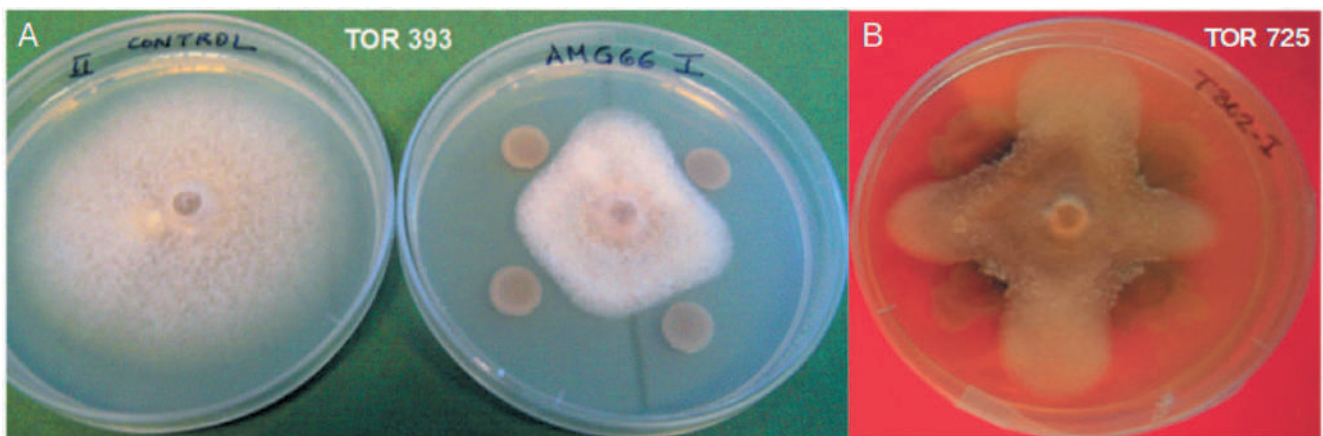


Figura 4. (A) Enfrentamiento dual entre *Fusarium solani* TOR-393 y *Pseudomonas* sp. AMG66. A la izquierda se observa el crecimiento de *F. solani* sin bacterias y a la derecha el crecimiento inhibido de *F. solani* en presencia de bacterias. (B) Crecimiento romboidal de la colonia de *F. solani* TOR-725 en presencia de *Bacillus aryabhattai* RBA302 (Rodríguez-Navarro, D.N.).

cimiento bacteriano, se considera un resultado positivo (Gong y col., 2012).

Producción de Cianuro o ácido cianhídrico (HCN): para la detección cualitativa de HCN se empleó el Medio King B modificado o Agar para el aislamiento de *Pseudomonas* suplementado con glicina (4,4 g/L). Se sembró una alícuota de 10 µL de un cultivo fresco del microorganismo a testar en el centro de la placa. Posteriormente, se colocó sobre la tapa de la placa de Petri un papel de filtro esterilizado, saturado con una solución de ácido pícrico: 2,5 g/L ácido pícrico y 12,5 g/L carbonato de sodio. Tras sellar la placa con parafilm, las placas se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo a testar por un periodo de tres a siete días. Un cambio en el color del papel de filtro-ácido pícrico de amarillo a naranja, rojo, marrón o a marrón-rojizo se considera como resultado positivo débil (+), moderado (++) o fuerte (+++). (Bakker y Schippers, 1986) (Figura 3c).

Resultados y Discusión

Control del desarrollo de aislados de *Fusarium solani*

Todas las bacterias empleadas fueron capaces de controlar el desarrollo de ambos aislados de *F. solani*, aunque se observaron claras diferencias dependiendo de la combinación *Fusarium*-bacteria, tanto en la capacidad de reducir el desarrollo micelial como en el control de la esporulación.

En relación al aislado TOR-725, los mejores resultados de inhibición del crecimiento se alcanzaron con las estirpes de *Pseudomonas* RBA83 y AMG66 (77% y 67%, respectivamente) (Tabla 3a). Además, AMG66 redujo significativamente la esporulación de TOR-725, respecto al control (Tabla 3a, anexo). La cepa BPA4 de *B. amyloliquefaciens* presentó un menor porcentaje de inhibición (<50%) del aislado de *Fusarium* TOR-725, a pesar de sintetizar diferentes de enzimas relacionadas con el potencial de biocontrol fúngico (celulasa –la única cepa que exhibió esta actividad–, β-glucosidasa, proteasa y amilasa). En concordancia con los resultados del aislado TOR-725, las estirpes AMG66 y RBA83 fueron también las más eficaces en el control

Cepa bacteriana	Área de crecimiento del micelio (mm ²)			Tasa de crecimiento (mm ² /día)
	Día 2	Día 5	Día 8	
Control	18,52 ± 7,65 a	41,07 ± 3,16 a	56,74 ± 0,0 a	7,64 R ² (0,99)
BPA4	6,34 ± 0,20 b	19,22 ± 1,05 b	29,48 ± 2,07 bc	3,85 R ² (0,92)
RBA302	7,11 ± 0,15 b	18,92 ± 0,63 b	26,32 ± 1,67 c	3,20 R ² (0,92)
RBA83	6,67 ± 0,16 b	10,35 ± 0,38 c	12,99 ± 1,04 e	1,05 R ² (0,79)
AMG66	5,19 ± 0,12 b	11,13 ± 1,02 c	18,88 ± 2,07 d	2,28 R ² (0,81)
AMG77	6,16 ± 0,15 b	16,88 ± 0,54 b	31,55 ± 1,12 b	4,23 R ² (0,97)

Dentro de cada columna, los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD P <0,05

Tabla 3a. Desarrollo micelial de *Fusarium solani* TOR-725 en presencia de bacterias.

TOR-725 Esporulación (conidias/mm ²) x 100					
Control	BPA4	RBA302	RBA83	AMG66	AMG77
94,7 ± 7,1 ab	121 ± 13,6 a	88,8 ± 9,9 abc	63,2 ± 9,3 bc	54,9 ± 7,1 c	122 ± 10,7 a

Los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD P <0,05

Anexo Tabla 3a. Esporulación de *Fusarium solani* TOR-725 en presencia de bacterias.

Cepa bacteriana	Área de crecimiento del micelio (mm ²)		Tasa de crecimiento (mm ² /día)
	Día 5	Día 8	
Control-I	39,04 ± 0,39 a	56,75 ± 0,0 a	5,90 R ² (0,99)
BPA4-I	10,04 ± 0,77 c	11,31 ± 0,85 c	0,85 R ² (0,32)
RBA302-I	16,53 ± 0,11 b	19,82 ± 0,43 b	1,10 R ² (0,90)
AMG66-I	9,75 ± 0,18 c	13,0 ± 0,33 c	1,08 R ² (0,92)
	Día 7	Día 12	
Control-II	6,45 ± 0,37 a	56,75 ± 0,0 a	10,06 R ² (0,99)
AMG77-II	5,20 ± 0,31 b	13,01 ± 0,68 b	1,57 R ² (0,95)
RBA83-II	3,62 ± 0,10 c	5,95 ± 0,09 c	0,47 R ² (0,98)

Dentro de cada columna, para cada experimento (I ó II), los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD P <0,05

Tabla 3b. Desarrollo micelial de *Fusarium solani* TOR-393 en presencia de bacterias.

del aislado TOR-393 (Figura 4A); no obstante, el control de BPA4 sobre TOR-393 es semejante (80% de inhibición) al de la estirpe AMG66 de *Pseudomonas* (77% de inhibición) (Tabla 3b). No se encontraron diferencias significativas en la esporulación de TOR-393 en presencia de las bacterias. Cabe destacar que sólo las estirpes del género *Pseudomonas* produjeron HCN. Además, traba-

jos previos han demostrado que las cepas AMG de *Pseudomonas* son capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* entre otros hongos fitopatógenos (comunicación personal del Prof. J. Ollero).

Control del desarrollo de especies de oomicetos

En las Tablas 4a-4d se presentan los resultados de inhibición del desarro-

Cepa bacteriana	Área de crecimiento lo del oomiceto (mm ²)			Tasa de crecimiento (mm ² /día)
	Día 5	Día 7	Día 9	
Control	24,68 ± 2,02 a	30,30 ± 1,64 a	36,10 ± 0,0 a	2,88 R ² (0,71)
BPA4	6,99 ± 0,25 b	13,08 ± 1,47 b	13,86 ± 1,75 c	1,72 R ² (0,48)
RBA302	25,40 ± 0,53 a	30,30 ± 0,51 a	30,76 ± 0,52 b	1,34 R ² (0,69)
RBA83	6,06 ± 0,30 b	7,79 ± 0,47 c	8,13 ± 0,42 d	0,51 R ² (0,49)
AMG66	7,38 ± 0,43 b	7,12 ± 0,18 c	8,65 ± 0,30 d	0,32 n.s.
AMG77	6,47 ± 0,43 b	6,78 ± 0,43 c	9,19 ± 0,36 d	0,68 R ² (0,57)

Dentro de cada columna, los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD P <0,05. n.s. no significativo

Tabla 4a. Desarrollo micelial de *Phytophthora cinnamomi* CECT2965 en presencia de bacterias.

Cepa	Área de desarrollo del oomiceto (mm ²)				Tasa de crecimiento (mm ² /día)
	3 días	5 días	7 días	10 días	
Control	16,86 ± 0,65 a	32,66 ± 2,28 a	45,37 ± 2,35 a	56,75 ± 0,0 a	5,65 R ² (0,97)
BPA4	3,71 ± 0,42 bc	4,79 ± 0,15 b	4,95 ± 0,13 b	7,47 ± 1,09 b	0,51 R ² (0,92)
RBA302	4,61 ± 0,38 b	5,13 ± 0,38 b	5,40 ± 0,27 b	5,71 ± 0,34 c	0,15 R ² (0,95)
RBA83	3,74 ± 0,29 bc	4,34 ± 0,17 b	4,60 ± 0,17 b	5,00 ± 0,28 cd	0,17 R ² (0,95)
AMG66	2,91 ± 0,29 c	3,91 ± 0,23 b	3,97 ± 0,19 b	4,52 ± 0,17 cd	2,21 R ² (0,86)
AMG77	2,84 ± 0,11 c	3,18 ± 0,19 b	3,45 ± 0,28 b	3,56 ± 0,29 d	0,10 R ² (0,90)

Dentro de cada columna, los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD P <0,05

Tabla 4b. Desarrollo micelial de *Phytophthora cinnamomi* MYC 003 en presencia de bacterias.

llo de los oomicetos *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium spiculum* en presencia de bacterias. Todas las cepas bacterianas inhibieron entre 80-94% el desarrollo micelial de los tres aislados de *P. cinnamomi* evaluados, pero de manera consistente destacan por su eficacia las bacterias RBA83, AMG66 y AMG77, todas pertenecientes al género *Pseudomonas*. No obstante, se observó cierta interacción bacteria x oomiceto, pues al contrario que con el aislado CECT2965 (Tabla 4a), la cepa RBA302 de *Bacillus* ejerció sobre el aislado MYC 003 un control semejante al que presentaron algunas cepas de *Pseudomonas* (Tabla 4b). La tasa de crecimiento del aislado PE 90, en presencia de las cepas RBA302, RBA83, AMG66 y AMG77, no se ajusta a un crecimiento lineal (Tabla 4c), de hecho no hay diferencias significativas en los valores del área del micelio a lo largo del tiempo (indicados por letra mayúscula). De manera consistente, todas las bacterias detienen el crecimiento de los aislados *P. cinnamomi* de a partir del quinto día de enfrentamiento (MYC 003 y PE 90) o del séptimo día (CECT2965), de ahí la falta de ajuste a un modelo lineal de crecimiento.

En el caso del aislado de *Py. spiculum* PA 54, sólo se evaluó la actividad de biocontrol de las tres estirpes de *Pseudomonas* (Tabla 4d). Las placas control crecieron ocupando toda el área de la placa de cultivo desde el primer día de la cuantificación, de modo que no es posible determinar la tasa de crecimiento de este aislado en ausencia de las bacterias. La estirpe RBA 83 fue la única efectiva en el control de este aislado, y no permitió desde el inicio su desarrollo, de ahí que la tasa de crecimiento estimada no sea significativa. En resumen, la inhibición del desarrollo *in vitro* de hongos y oomicetos patógenos puede alcanzarse con bacterias que presenten una alta actividad de enzimas hidrolíticas relacionadas con el biocontrol, sobre todo con estirpes del género *Pseudomonas*. No obstante, se ha observado que la inhibición del desarrollo del micelio puede presentar cierta especificidad bacteria-patógeno, así como la inhibición de la esporulación, en el caso de los aislados de *Fusarium*. Estas cepas bacterianas podrían constituir un eficaz agente de control biológico en la lucha contra las enfermedades de la fusariosis en fresa y la 'seca' de encinas y alcornoques.

Cepa bacteriana	Área de desarrollo del oomiceto (mm ²)			Tasa de crecimiento (mm ² /día)
	Día 3	Día 5	Día 7	
Control	21,56 ± 0,38 a	47,90 ± 5,42 a	56,74 ± 0,0 a	8,79 R ² (0,76)
BPA4	11,93 ± 0,60 c	16,15 ± 0,98 b	19,39 ± 0,87 b	1,87 R ² (0,77)
RBA302	16,23 ± 0,38 b A	17,82 ± 0,57 b A	17,99 ± 0,49 c A	0,36 R ² (0,25)
RBA83	7,71 ± 0,29 e A	9,25 ± 0,35 c A	9,25 ± 0,35 d A	0,12 R ² (0,08)
AMG66	8,66 ± 0,28 de A	8,70 ± 0,29 c A	8,87 ± 0,30 d A	0,05 R ² (0,02)
AMG77	9,17 ± 0,39 d A	7,78 ± 0,34 c A	8,09 ± 0,31 d A	0,01 R ² (0,0008)

Dentro de cada columna, los datos seguidos de la misma letra minúscula, y dentro de cada fila los datos seguidos de la misma letra mayúscula, no difieren significativamente, test LSD P <0,05

Tabla 4c. Desarrollo micelial de *Phytophthora cinnamomi* PE 90 en presencia de bacterias.

Cepa	Área de desarrollo del oomiceto (mm ²)			Tasa de crecimiento (mm ² /día)
	3 días	5 días	7 días	
Control	56,75	56,75	56,75	—
RBA83	4,88 ± 0,55 ab	5,07 ± 0,50 c	5,71 ± 0,67 c	0,21 R ² (ns)
AMG66	3,96 ± 0,28 b	10,11 ± 0,97 b	23,77 ± 1,12 b	4,36 R ² (0,82)
AMG77	5,44 ± 0,13 a	16,90 ± 1,15 a	34,85 ± 0,74 a	6,36 R ² (0,86)

Dentro de cada columna, los datos seguidos de la misma letra no difieren significativamente, test LSD P <0,05. Los datos del tratamiento control no se han incluido en el ANOVA

Tabla 4d. Desarrollo micelial de *Pythium spiculum* PA 54 en presencia de bacterias.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado en el marco de los proyectos INIA RTA 2013-00062-C05-02 y RTA 2014-00063-C04-01 co-financiados con fondos FEDER dentro del Programa Operativo 'Crecimiento Inteligente'.

Abstract

Due to the phase out of most of the soil fumigants and other chemical compounds used for the control of pest and plant diseases, it is compulsory to search for powerful and more environmentally-friendly alternatives without crops yield reduction. Thus, the use of microorganisms to protect plants from pathogens, the so-called biological control, is an emergent agricultural practice that will expand as alternative to chemical pesticides in a near future. Results of this study demonstrate that several bacterial strains belonging to *Bacillus* and *Pseudomonas* genera can efficiently control the *in vitro* development of plant pathogens such as *Fusarium solani*, pathogen to strawberry and *Phytophthora cinnamomi* and *Pythium spiculum* described as fungal agents involved in oak decline syndrome ("seca").

Bibliografía

- ! Bakker, A.W.; Schippers, B. 1986. *Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and Pseudomonas spp. -Mediated plant growth-stimulation*. Soil Biol. Biochem. 19: 451-457.
- Bhattacharyya, P. N.; Jha, D. K. 2012. *Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture*. World J. Microbiol. Biotechnol. 28: 1327-1350.
- Beneduzi, A.; Ambrosini, A.; Passaglia, L.M. 2012. *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): The potential as Antagonist and Biocontrol Agents*. Gen. Mol. Biol. 35: 1044-1051.
- Cowan, S.T.; Steel, K.J. 1965. *In: Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press. New York.
- Duque-Lazo, J.; Navarro-Cerrillo, R.M.; van Gils, H.; Groen, T.A. 2018. *Forecasting oak decline caused by Phytophthora cinnamomi in Andalusia: Identification of priority areas for intervention*. Forest Ecology Management 417: 122-136. DOI:10.1016/j.foreco.2018.02.045
- Gong, X.; Gruninger, R. J.; Qi, M.; Paterson, L.; Forster, R. J.; Teather, R. M.; Mcallister, T. A. 2012. *Cloning and identification of novel hydrolase genes from a dairy cow rumen metagenomic library and characterization of a cellulase gene*. BioMed Central 5: 566-71.
- Harley, J.P.; Prescott, L.M. 2002. *In: Laboratory Exercises in Microbiology*. 5th Ed. Boston, Mass. McGraw-Hil. ISBN: 007233456.
- Mardanov, A.M.; Hadieva, G.F.; Lutfullin, M.T.; Khilyas, I.V.; Minnulina, L.F.; Gilyazeva, A.G.; Bogomolnaya, L.M.; Sharipova, M.R. 2017. *Bacillus subtilis strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi*. Agric. Sciences 8: 1-20 doi.org/10.4236/as.2017.81001
- Pastrana, A.M.; Capote, N.; De Los Santos B.; Romero, F.; Basallote-Ureba, M.J. 2014a. *First report of Fusarium solani causing crown and root rot on strawberry crops in Southwestern Spain*. Plant Disease Note 98 (1) 00-00. doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0682-PDN
- Pastrana, A.M.; Basallote-Ureba, M.J.; Capote, N. 2014b. *Fusarium solani: un nuevo patógeno en el cultivo de la fresa (Fragaria x ananassa Duch.)*. Phytoma-España, 257: 42-46.
- Redondo, C.; Larenas, J.; López-Aranda, J.M.; Soria, C.; Martínez-Treceño, A.; Melgarejo, P.; De Cal, A. 2012. *Comportamiento de variedades comerciales de fresa frente a enfermedades en viveros*. XVI Congreso Nacional de la SEF. Málaga.
- Teather, R. M.; Wood, P. J. 1982. *Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen*. Appl. Environ. Microbiol. 43(4): 777-780.
- Triverdi, P.; Pandey, A.; Palni, L.M. 2008. *In vitro evaluation of antagonistic properties of Pseudomonas corrugata*. Microbiol. Research 163: 329-336
- Zentmyer, G.A. 1983. *The world of Phytophthora*. In: *Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology and pathology* (Ed. Erwin DC, Bartnicki-Garcia S & Tsao PH), pp. 1-8. APS, St Paul (US).