



- *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y/o *Verticillium dahliae* importantes patógenos vasculares del tomate

## Control de la marchitez vascular del tomate mediante aplicación de biofungicidas

**En España los métodos más utilizados para el control de las enfermedades vasculares son la desinfección del suelo con biocidas y la mejora genética**

*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y/o *Verticillium dahliae* son importantes patógenos vasculares del tomate. Su control es difícil debido a su crecimiento endofítico y a su persistencia en el suelo. En España los métodos más utilizados para el control de las enfermedades vasculares son la desinfección del suelo con biocidas y la mejora genética. Sin embargo, es importante encontrar nuevas alternativas de control, como el control biológico, que formen parte del control integrado de la enfermedad. En el laboratorio del departamento de protección vegetal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (Inia) se ha conseguido un hongo antagonista, *Penicillium oxalicum*, que es eficaz contra la marchitez vascular de tomate. En este artículo se describe distintos aspectos de este nuevo biofungicida.

El control biológico mediante la aplicación de antagonistas (biofungicidas) puede ser una alternativa a otros métodos de control y, en todo caso, es una herramienta más a utilizar en el control integrado de enfermedades vegetales (Mao et al., 1998). En la literatura hay citados algunos agentes de biocontrol eficaces contra la fusariosis vascular del tomate como *Cephalosporium* (Phillips, 1967), *Pseudomonas spp* (Lemanceau y

Alabouvette, 1993)), *Fusarium* no patógenos (Tamietti et al., 1993) y combinaciones de *Pseudomonas* y *Fusarium* no patógenos (Lemanceau y Alabouvette, 1993).

En este artículo se describe una estrategia de control de la marchitez vascular del tomate causada por *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL) y/o *Verticillium dahliae* (VD) mediante la aplicación de un agente de biocon-

trol, *Penicillium oxalicum* (PO), desarrollada en el laboratorio.

### Selección de antagonistas

Se llevaron a cabo ensayos en invernadero con el fin de probar el potencial de controlar a FOL entre determinados hongos con conocida capacidad de romper las paredes del patógeno. Los hongos antagonistas ensayados fueron *Mucor rouxii*, *Aspergillus*

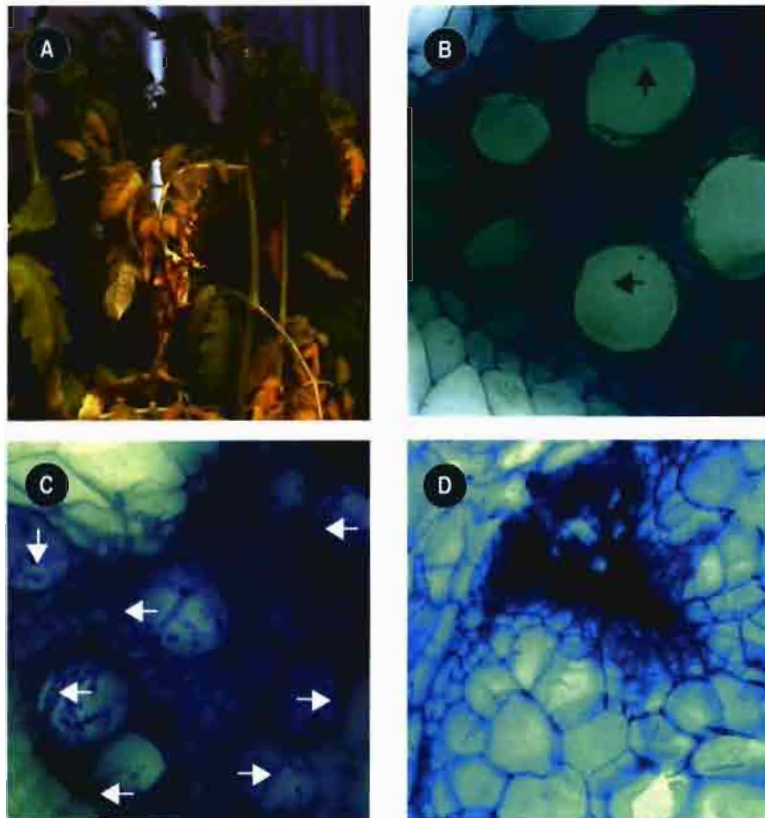


De Cal A., Larena I., Sabuquillo P. y Melgarejo P.

[melgar@inia.es](mailto:melgar@inia.es)

Departamento de Protección Vegetal, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)





**Figura 1:**  
**A) Planta de tomate infectada con *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL).**  
**B) Corte del tallo de una planta de tomate infectada con FOL y tratada con *Penicillium oxalicum* (PO). Se observan las células del cambium y algún vaso del xilema con FOL (flechas).**  
**C) Corte del tallo de una planta de tomate infectada con FOL no tratada con PO. Se observan los vasos del xilema con FOL (flechas).**  
**D) Corte del tallo de una planta de tomate infectada con FOL y no tratada con PO. Se observan las células del cambium colapsadas y la falta de vasos xilemáticos.**

*nidulans*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* y *Trichoderma spp.* Las plantas de tomate se inocularon con microconidias de FOL por inmersión de las raíces en el transplante y se regaron con suspensiones de esporas de los potenciales hongos antagonistas. A los 35 días después del transplante se observó reducción de la gravedad de la enfermedad inducida por FOL en suelo estéril y no estéril en las plantas tratadas con PO (De Cal et al., 1995). Sin embargo, las unidades formadoras de colonias de FOL en el suelo o en la rizosfera de las plantas de tomate no ser reducían por efecto de PO (De Cal et al., 1995).

Estos experimentos mostraron que PO reducía la fusariosis vascular del tomate y que el control de la enfermedad no estaba relacionado con una reducción de la población de FOL: el patógeno permanecía en la rizosfera pero era incapaz de inducir síntomas de la enfermedad. Esto sugería que ocurrían mecanismos de com-

petencia por nutrientes, factores de crecimiento y/o espacio, o de resistencia inducida (Baker, 1981).

### Resistencia inducida por PO en plantas de tomate

Se ensayó la capacidad de PO para inducir resistencia en plantas de tomate. Para ello se inoculó FOL en las hojas y se trataron las raíces de las plantas con una suspensión de esporas de PO. PO controló la enfermedad, colonizó la rizosfera de las plantas de tomate, pero no se detectó en el

interior de los tallos. PO y FOL permanecieron espacialmente separados, lo que demostró que en la planta se inducían mecanismos de resistencia sistémicos que eran capaces de reducir la infección de *Fusarium* (De Cal et al., 1997a). Este fenómeno de resistencia inducida es muy interesante en hongos tipo *Fusarium* en los que con pocas infecciones en el sistema radicular el hongo puede llegar a colonizar la planta y causarle enfermedad.

Se hicieron más experimentos para explorar esta posibilidad en distintos sistemas de cultivo (hidropónico, en suelo y en turba) y con diferentes cultivares de tomate de distintos niveles de susceptibilidad a la raza 2 de FOL (Super Roma, VFN, Precodor, Lorena y Ramón). La inoculación de FOL se hizo con microconidias o con clamidosporas. En todos los casos se conseguía controlar la enfermedad sin reducir la población de FOL de la rizosfera siendo esta colonizada por PO (De Cal et al., 1997b). Esto sugería un mecanismo de resistencia inducida de tipo general.

En los últimos años estos fenómenos de "inmunización" o de resistencia inducida han recibido atención creciente (Kúc, 1987; Benhamou et al., 1996).

Se ha descrito resistencia inducida contra *Fusarium* por *Fusarium* no patógenos o otras formas especiales de *Fusarium* (Tamietti et al., 1993), por otros microorganismos (Verma y Allison, 1960) o por factores abióticos (Abbattista et al., 1988). Esta resistencia se ha atribuido a incrementos en los niveles de peroxidasas y polifenoloxidasas (Abbattista et al., 1988), b-1,3-glucanasas y chitinases (Tamietti et al., 1993), fenoles (Abbattista et al., 1988) y cambios en niveles de calcio (Beckman, et al., 1991).

Se hicieron diversos experimentos para ver a que mecanismos se podía atribuir la resistencia inducida observada. Los primeros ensayos sugirieron que no había relación entre la resistencia y la acumulación de proteínas de

■ **En este artículo se describe una estrategia de control de la marchitez vascular del tomate causada por *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* y/o *Verticillium dahliae* mediante la aplicación de un agente de biocontrol, *Penicillium oxalicum*, desarrollada en el laboratorio**

defensa de tipo PR (García-Lepe et al., 1998). Uno de los fenómenos que se observaba en los cultivos hidropónicos en cámara de cultivo, era que las plantas tratadas con PO consumían más solución nutritiva que las no tratadas, cuando estaban infectadas con FOL, lo que sugería que PO prevenía parcialmente el bloqueo o colapso del xilema en las plantas infectadas.

Se hicieron experimentos para identificar diferencias en el sistema vascular de plantas tratadas y no tratadas con PO que pudieran explicar el fenómeno de resistencia y el control de la enfermedad. En plantas no tratadas con PO e infectadas con FOL el cambium se reducía en un 70-100%, ocurría un incremento en el número de haces vasculares y un descenso en el número de vasos xilemáticos (20%) en los que el diámetro se reducía en un 20-30% en hipo y epicotilos (Fig. 1).

**Experimento 1, de izquierda a derecha: plantación de tomates 20 días después del trasplante y plantación de tomates 70 días después del trasplante en Villa del Prado (Madrid).**



■ **Se llevaron a cabo ensayos en invernadero con el fin de probar el potencial de controlar a *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* entre determinados hongos con conocida capacidad de romper las paredes del patógeno**

El porcentaje de vasos colonizados con FOL estaba positivamente correlacionado con la gravedad de la enfermedad.

**un extraordinario terreno de cultivo ?**



## cuadro 1:

**Efecto del momento de aplicación de *Penicillium oxalicum* (PO) a plantas de tomate en el control de la fusariosis vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2, (FOL) en un cámara de cultivo, 21 días después del trasplante, y en invernadero 60 días después del trasplante**

Tratamientos	AUDPC*	
	Cámara de cultivo**	Invernadero***
T1: A semillas antes de sembrar	357	ne
T2: A semillas justo después de sembrar	389	ne
T3: Al semillero 29 y 15 días antes del trasplante y a las plántulas 7 y 0 días antes del trasplante	ne	1569*
T4: Al semillero 15 días antes del trasplante y a las plántulas 7 y 0 días antes del trasplante	ne	1710*
T5: Al semillero 15 días antes del trasplante y a las plántulas justo antes del trasplante	ne	1891
T6: A las plántulas 7 y 0 días antes del trasplante	ne	1666*
T7: A las plántulas 7 días antes del trasplante	197*	ne
T8: A las plántulas 4 días antes del trasplante	345	ne
T9: A las plántulas justo antes del trasplante	183*	1937
T10: No tratamiento con PO	361	1178

\*AUDPC, área bajo la curva de progreso de la enfermedad. Los datos seguidos por \* en cada columna son significativamente diferentes del control sin tratar ( $P=0.05$ ).

\*\* Los datos son la media de 15 macetas, con 5 plantas cada maceta. ne=no ensayado.

\*\*\* Los datos son la media de 5 container, con 4 plantas en cada container. ne=no ensayado.

## Cuadro 2:

**Control de la gravedad de la enfermedad y del enanismo causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate tratadas con *P. oxalicum*\***

Días después del trasplante	% control de la gravedad de la enfermedad	% control de reducción del tamaño
20	40	20
30	40	50
50	32	35
60	32	28
80	40	50

\* Todos los datos son significativos ( $P=0.05$ ). Los datos son la media de diez repeticiones, con cinco plantas por repetición.

Sin embargo, las plantas inducidas con PO tenían menos enfermedad, no perdían el cambium, tenían menor número de haces vasculares y menos colonización vascular por FOL (fig. 1).

En resumen, tiene lugar un proceso de resistencia secuencial que restringe la invasión de FOL en plantas tratadas con PO: en primer lugar se limita la distribución secundaria de FOL dentro de los tejidos vasculares y en segundo lugar el tratamiento con PO previene la distorsión de las células del cambium y la diferenciación total de este (De Cal et al., 2000a).

Posteriormente se asociaron estos cambios morfológicos con los niveles endógenos de citoquininas en las plantas de tomate (De Cal et al., 2000b).

## Métodos de aplicación de *Penicillium oxalicum*

Varios factores pueden afectar el éxito del agente de biocontrol como la competencia ecológica y el momento y método de aplicación. PO es un organismo xerotolerante, mesofílico y que crece en un amplio rango de pH (Pascual et al., 1997), lo que lo hace ecológicamente competente en el suelo.

El método y momento de la de aplicación del organismo de biocontrol es crítico para su eficacia. Por ello se hicieron varios experimentos para investigar estos hechos.

Los tratamientos de PO se hicieron en diferentes momentos (cuadro 1).

La aplicación de PO a plántulas de tomate en semillero reduce la enfermedad causada por FOL en un 45-49% en el experimento en cámara de cultivo y en un 22-69% en invernadero. Sin embargo, no se obtiene reducción de la enfermedad cuando PO se aplica en las semillas.

Se hicieron también experimentos en invernadero para ver la duración del control, observándose control hasta los cien días del cultivo (De Cal y Melgarejo, 2001).

## Métodos para mejorar el biocontrol

Se pueden seguir varias estrategias para ello. Entre ellas se puede aplicar varias veces el agente de biocontrol.

Se hicieron experimentos aplicando PO de una a cuatro veces, la primera vez se aplicaba en semillero siete días antes del trasplante y las demás veces en distintos momentos ya en el terreno de asiento. Los resultados mostraron que las aplicaciones repetidas de PO prolongaban la duración del control sobre FOL cuando la incidencia de la enfermedad era alta.

Sin embargo, el momento de la aplicación no tenía efecto en la eficacia del control. La densidad de PO en la rizosfera del tomate era más alta en el caso de aplicaciones repetidas, pero no se obtenía relación entre la reducción de la enfermedad y las altas densidades de PO.

Experimento 2, de izquierda a derecha plantación de tomates 65 días después del trasplante y plantación de tomates 15 días después del trasplante en Aranjuez (Madrid).



■ Varios factores pueden afectar el éxito del agente de biocontrol como la competencia ecológica y el momento y método de aplicación que es crítico para su eficacia. Por ello se hicieron varios experimentos para investigar estos hechos

Se ha demostrado pues, que la aplicación repetida de PO mejora el control de FOL, especialmente en casos de enfermedades graves.



**agrocomponentes**  
componentes del invernadero

es posible.

VENTANAS MOTORREDUCTORES CREMALLERAS PANTALLAS TÉRMICAS MALLAS REFRIGERACIÓN CALEFACCIÓN SISTEMAS DE CONTROL

Greenhouses, components. Torre Pacheco, Murcia Spain Teléfono +34 968 58 57 76 Fax +34 968 58 57 70 www.agrocomponentes.es



## Cuadro 3:

**Porcentaje de incidencia de enfermedad inducida por varios patógenos después de la inoculación de plantas de tomate tratadas con *P. oxalicum*\*.**

Tratamiento	Patógeno				
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Verticillium spp.</i>
<i>P. oxalicum</i>	23 b	0 b	7 b	10 b	15 b
No tratamiento	95 a	67 a	53 a	33 a	57 a

\* Las medias seguidas por las mismas letras en cada columna no son significativamente diferentes por el test de Student-Newman-Keuls' ( $P=0.05$ ).

### Espectro de acción de *Penicillium oxalicum*

Varios autores han demostrado que la resistencia inducida no es específica de un solo patógeno.

Se investigó, por tanto el espectro de acción de PO en otros patógenos diferentes de FOL.

Se ensayaron seis hongos *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Verticillium dahliae*, *Verticillium spp.*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* y *P. parasitica*, la bacteria *Ralstonia solanacearum* y dos virus, ToMV y CMV, en experimentos de cámara de cultivo, invernadero y aire libre.

Los resultados mostraron que la aplicación de PO ( $6 \times 10^6$  conidias/g sustrato) en semillero siete días antes del trasplante controla las enfermedades causadas por *B. cinerea* (cámara de cultivo), *P. infestans*, *P. parasitica*, *V. dahliae*, CMV, ToMV (invernadero) y *Verticillium spp.* (aire libre) (cuadro 3).

Estos resultados demuestran que PO es efectivo frente a diferentes enfermedades de tomate.

Posteriormente se hicieron tres experimentos en campo abierto en plantaciones comerciales de tomate con suelos infestados naturalmente con FOL y *Verticillium spp.*

Las conidias de PO producidas en fermentación sólida (Larena et al., 2002) se aplicaron, mezcladas con el sustrato de fermentación, a una concentración de  $6 \times 10^6$  conidias/gr sustrato a semilleros con plántulas de tomate.

Siete días después las plántulas se trasplantaron a campo a-

bierto en tres campos situados uno en Villa del Prado (Madrid) (experimento 1), y dos en Aranjuez (Madrid) (experimentos 2 y 3).

La incidencia de FOL fue reducida de un 53 a un 15% en el experimento 1 y la de *Verticillium spp.* de un 62 a un 27% en el experimento 2 y de un 47 a un 25% en el experimento 3 (Larena et al., 2003).

### Conclusiones

PO reduce la marchitez vascular causada por la mayoría de los patógenos más comunes del tomate que invaden el sistema vascular como son FOL y VD en gran cantidad de experimentos llevados a cabo en diferentes condiciones.

Experimentos preliminares muestran que también puede controlar otras enfermedades del tomate causadas por virus y otros hongos.

La aplicación es sencilla, basta con regar el semillero con

una suspensión de conidias de PO y realizar el trasplante de las plántulas una semana más tarde. De esta forma se consigue una duración del control que puede llegar hasta los 100 días, y que se puede incrementar realizando más aplicaciones posteriormente.

Varias son las ventajas que ofrece este método de control:

- la cantidad de biofungicida que se tiene que aplicar es pequeña, puesto que se echa en semillero.

- la aplicación es muy sencilla y la puede realizar cualquier operario sin necesidad de especialización: basta con disolver el producto en agua y realizar un riego del semillero. También se puede aplicar en sólido junto con el sustrato de producción de las conidias,

- puede actuar sobre varios agentes patógenos, distintos cultivos, y combinarse con otros métodos con facilidad.

**■ *Penicillium oxalicum* reduce la marchitez vascular causada por la mayoría de los patógenos más comunes del tomate que invaden el sistema vascular como son *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Verticillium dahliae* en gran cantidad de experimentos llevados a cabo en diferentes condiciones**

### Agradecimientos:

Estos trabajos han sido posibles gracias a los proyectos AGL2000-0067-P4-03 (Ministerio de Ciencia y Tecnología) y 07M/0031/2002 (Comunidad Autónoma de Madrid). Agradecemos la ayuda técnica prestada por C. Simón, y A. Barrionuevo.

### Para saber más...

■ Bibliografía completa en [www.horticom.com?56474](http://www.horticom.com?56474).



SOLUCIONES NUTRICIONALES INTEGRADAS PARA VIVEROS PROFESIONALES



# Use la Cabeza...

...FLORAPOWER LE DA EL PODER DE LA ELECCION

FLORAPOWER OFRECE LOS ELEMENTOS NECESARIOS PARA CREAR SOLUCIONES NUTRICIONALES QUE SATISFAGAN LO QUE EL PROFESIONAL DEMANDA PARA CADA FASE DE SU CULTIVO.

Los productos FloraPower aseguran los máximos beneficios para el productor, las plantas, y el medio ambiente. Todos los productos son altamente concentrados en nutrientes, se absorben completamente, y están libres de cloruros y otros elementos perjudiciales.

Los programas nutricionales equilibrados FloraPower conducen a un crecimiento óptimo y un uso eficiente de los fertilizantes, sin contaminación del sustrato y aguas subterráneas.



- **Multicote**  
Fertilizantes de liberación controlada
- **MultiSol**  
Fertilizantes solubles
- **MultiMix**  
Fertilizante de base para sustratos



**FERQUISA** Fertilizantes Químicos S.A.

Gonzalo de Córdoba 2, 2º 28010 MADRID Tel: +34 915912138 Fax: +34 915912552  
e-mail: office@ferquisa.es www.halfachem.com