



Universidad
Politécnica
de Cartagena



**Máster Universitario en
Técnicas Avanzadas en Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario**

**Interacciones entre *Pythium ultimum* y
bacterias de la rizosfera en la patogénesis
de la podredumbre del tallo del brócoli**

**Alumna: M^a Ángeles Parra Sáez
Director: Juan Antonio Martínez López**

Cartagena, 16 de junio de 2014



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

AUTORIZACIÓN DE LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

D. Juan Antonio Martínez López

EN CALIDAD DE DIRECTOR INFORMA:

Que el trabajo titulado “**Interacciones entre *Pythium ultimum* y bacterias de la rizosfera en la patogénesis de la podredumbre del tallo del brócoli**”, ha sido realizado por **D^a. María Ángeles Parra Sáez**, bajo la dirección y supervisión de D. Juan Antonio Martínez López y que se autoriza al alumno a la defensa del mismo.

En Cartagena, a 16 de junio de 2014

Fdo.: Juan Antonio Martínez López



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Departamento de Producción Vegetal



SAKATA

La investigación desarrollada en el presente trabajo está encuadrada dentro del Proyecto de Investigación y Desarrollo entre la **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA** y la empresa **SAKATA SEED IBÉRICA** titulado:

“AGENTES PARASITARIOS IMPLICADOS EN UNA NUEVA ENFERMEDAD DEL BRÓCULI Y SERVICIO GENERAL DE IDENTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES Y PATÓGENOS”,

Proyecto que es dirigido por el Dr. Juan Antonio Martínez López del Grupo de Investigación Protección de Cultivos

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE ESTUDIO

La realización de los estudios conducentes a este trabajo presentado como Trabajo Fin de Máster en la Universidad Politécnica de Cartagena forma parte del trabajo realizado por la becaria y alumna del Máster TAIDAA enmarcado dentro de un proyecto de investigación financiado por la empresa SAKATA SEED IBÉRICA que se está desarrollando desde el año 2013. Hasta el momento se han publicado o están en vías de publicación los trabajos listados más abajo, pero es objetivo de la empresa y del grupo investigador que se aumente el número de publicaciones conforme vaya desarrollándose la investigación.

- ▶ Martínez, J.A., Ibarra, A., **Parra, M.A.** 2013. Podredumbre blanda de la médula del brócoli: agentes patógenos aislados y sus posibles implicaciones. *Agrícola Vergel*, 369: 317-321.

- ▶ **Parra, M.A.**, Ibarra, A., Cifuentes, D.C., Martínez, J.A. 2014. Interactions between *Pythium ultimum* and rhizosphere bacteria causing stem rot in broccoli. 66th International Symposium on Crop Protection. May 20, 2014. Ghent, Belgium. La comunicación completa se publicará en: *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 79: (en prensa), 2015.

- ▶ **Parra, M.A.**, Ibarra, A., Cifuentes, D.C., Todorovska, E., Martínez, J.A. New disease caused by *Pythium ultimum* on mature broccoli florets and its interaction with associated bacteria of rhizosphere. En preparación.

- ▶ **Parra, M.A.**, Ibarra, A., Cifuentes, D.C., Todorovska, E., Martínez, J.A. Phenotypic and genotypic characterization of a new isolate of *Pythium ultimum* causing decay in mature broccoli florets. En preparación.

AGRADECIMIENTOS

A Juan Antonio Martínez, por tu motivación, dedicación y apoyo, me transmitiste inquietud desde que me presentaste este Proyecto, gracias por confiar en mí para llevarlo a cabo, este trabajo es también tuyo.

A Sakata Seed Ibérica, S.L.U., es especial a Antonio Ibarra por creer en este proyecto.

Agradezco también a Dina Cifuentes por la ayuda y servicio prestado para la realización de los análisis genéticos de los aislados.

Mis amigas Desi Naveira, Eli Martínez, Emperatriz García y Touria Belkasmi, vuestra ayuda ha sido muy importante, para los buenos y malos momentos.

A la estudiante de Máster de la Universidad de Goce Delcev-Stip de Macedonia, Elena Todorovska, que con tanto entusiasmo ha conseguido hacer esporular nuestra cepa de *Pythium ultimum* durante su estancia en la UPCT.

Por último, no me puedo olvidar de mi familia, amigos y pareja, a ellos les dedico este esfuerzo, este trabajo, esta constancia, no podía ser menos cuando ellos me dedican lo mismo superadamente.

A todos ellos gracias por contribuir en mi formación, ya formáis parte de mi vida.

“En cuestiones de cultura y de saber, sólo se pierde lo que se guarda; sólo se gana lo que se da.” Antonio Machado.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
1. RESUMEN (ABSTRACT).....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. El brócoli en la Región de Murcia.....	3
2.1.1. Generalidades de la planta.....	3
2.1.2. Propiedades y hábitos de consumo.....	4
2.1.3. Superficie cultivada.....	5
2.1.4. Producción.....	6
2.1.5. Distribución y destino.....	6
2.2. Podredumbres blandas de las Brasicáceas. Agentes patológicos implicados.....	7
2.2.1. Podredumbres bacterianas.....	7
2.2.2. Podredumbre blanda acuosa o podredumbre blanca ocasionada por <i>Sclerotinia</i> sp.....	11
2.2.3. Establecimiento de una hipótesis para dilucidar la etiología de la podredumbre blanda del tallo.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. Aislamiento de microorganismos de tejidos sintomáticos.....	17
3.2. Identificación de microorganismos.....	19
3.2.1. Caracteres fenotípicos de los aislados bacterianos.....	19
3.2.2. Caracteres fenotípicos del aislado de <i>Pythium ultimum</i>	20
3.2.3. Identificación de los aislados bacterianos mediante secuenciación del ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S).....	20
3.2.3.1. Aislados y condiciones de cultivo.....	20
3.2.3.2. Extracción del ADN genómico.....	21

Contenido	Página
3.2.3.3. Amplificación PCR y secuenciación.....	21
3.2.4. Identificación de <i>Pythium ultimum</i> mediante secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal (ADNr ITS).....	22
3.2.4.1. Aislados y condiciones de cultivo.....	22
3.2.4.2. Extracción del ADN genómico.....	22
3.2.4.3. Amplificación PCR y secuenciación.....	22
3.3. Pruebas de confrontación <i>in vitro</i> entre microorganismos.....	23
3.4. Crecimiento <i>in vitro</i> de una población mixta de microorganismos.....	26
3.5. Inoculación de microorganismos a muestras de tejidos vegetales sanos.....	29
4. RESULTADOS	32
4.1. Aislamiento de microorganismos de piezas enfermas.....	32
4.2. Identificación de aislados potencialmente patógenos.....	33
4.3. Interacciones <i>in vitro</i> entre los microorganismos implicados.....	35
4.4. Crecimiento <i>in vitro</i> de los microorganismos implicados.....	40
4.5. Pruebas de inoculación en fragmentos de plantas.....	44
5. DISCUSIÓN	48
5.1. Interacciones entre los microorganismos estudiados.....	48
5.2. Implicaciones parasitarias de los microorganismos potencialmente patógenos.....	53
5.3. Perspectivas del desarrollo completo de la investigación en curso.....	55
5.4. Conclusiones.....	55
6. BIBLIOGRAFÍA	57

1. RESUMEN (ABSTRACT)

Interacciones entre *Pythium ultimum* y bacterias de la rizosfera en la patogénesis de la podredumbre del tallo del brócoli

RESUMEN

Palabras clave: hifas dañadas, crecimiento del micelio, *Pseudomonas putida*, *Ochrobactrum* sp., bacterias promotoras del crecimiento vegetal, rizoplasma

La podredumbre interna del tallo floral del brócoli se describe por medio de una sintomatología que se asocia comúnmente a la enfermedad denominada podredumbre blanda bacteriana ocasionada por la bacteria *Erwinia carotovora*. Sin embargo, en este trabajo se ha aislado al hongo *Pythium ultimum* creciendo, al mismo tiempo, con varias especies de bacterias que habitan corrientemente en los suelos del interior del tallo floral de piezas de brócoli maduras afectadas de podredumbre blanda en cultivos del sureste de España durante el año 2012. *P. ultimum* causa “*damping-off*” en numerosas plántulas de vivero, incluido el brócoli. Sin embargo, no se ha descrito esta especie como causante de enfermedad en tallos de pellas maduras de esta especie vegetal. Se aisló *P. ultimum* del interior de tallos de piezas con síntomas de pardeamiento y descomposición de tejidos. Los análisis microbianos revelaron que, además del hongo, estaban creciendo varias especies bacterianas. Entre estas bacterias se identificaron dos especies típicas del rizoplasma de las plantas: *Pseudomonas putida* y una especie perteneciente al género *Ochrobactrum*. El estudio de la interacción *in vitro* entre *P. ultimum* y las dos bacterias se realizó por medio de ensayos de confrontación y de crecimiento sobre placas Petri con agar de patata o agar de recuento total, creciendo durante 5 días a 26°C. Las áreas de las colonias y las tasas de crecimiento se midieron calculando las áreas del micelio del hongo durante su fase lineal y de desaceleración creciendo confrontado o en contacto con cada una de las bacterias. El crecimiento micelial se ajustó a una típica ecuación de crecimiento de hongos en placa Petri. *Ochrobactrum* sp. retardó el crecimiento del micelio del hongo durante la fase lineal de éste. Esto sugiere que esta bacteria es capaz de sintetizar toxinas difusibles contra *P. ultimum*. *Ochrobactrum* sp. también indujo daños en las hifas, especialmente sobre el micelio sumergido del hongo. Sin embargo, este efecto deletéreo de la bacteria contra el hongo fue escaso cuando los dos microorganismos crecieron juntos. Los resultados sugieren que las especies bacterianas encontradas dentro del tejido afectado procedían de la rizosfera y penetraron al interior por el proceso de infección y colonización del hongo a partir del suelo. Estas bacterias pueden interferir con el hongo durante la colonización de los tejidos. Los experimentos de inoculación sobre fragmentos de plantas sanos apoyan esta hipótesis. Finalmente, se está llevando a cabo la prueba de inoculación sobre plantas para tratar de reproducir los síntomas y comprobar los postulados de Koch.

Número de citas bibliográficas: 60

Número de tablas: 4

Número de figuras: 18

Número de ecuaciones: 1

Interactions between *Pythium ultimum* and rhizosphere bacteria causing stem rot in broccoli**ABSTRACT**

Key words: hyphal damage, mycelial fungal growth, *Pseudomonas putida*, *Ochrobactrum* sp., plant growth promoting bacteria, rhizoplane

Internal stem rot of broccoli is a disease which it is commonly associated to bacterial soft rot caused by *Erwinia carotovora*. However, we have isolated the fungus *Pythium ultimum* growing together several plant soil bacteria from affected tissues of mature broccoli cultivated in southeast Spain during 2012 season. *P. ultimum* causes damping-off of many seedlings in nurseries, including broccoli. However, this disease has not been reported causing disease on mature curds of broccoli. *P. ultimum* was isolated from several mature broccoli heads affected of browning and decomposition of internal stem tissues. Microbial analyses revealed some bacterial species grown on the same affected tissue. Among these bacteria we found two rhizoplane colonizing species: *Pseudomonas putida* and a species belongs to *Ochrobactrum* genus. *In vitro* interaction between *P. ultimum* and those bacterial species were evaluated. In this way, *P. ultimum* grew together with *P. putida* and/or *Ochrobactrum* sp. on Petri dishes containing either potato dextrose agar or plate count agar for 5 days at 26°C using a non-contact confrontation assay in order to evaluate the interaction between them. Mycelial growth curves and growth rates assessed from difference in colony areas during the both linear and deceleration phase were evaluated in all its interactions with two bacterial species. Mycelial growth curves fitted a typical kinetic equation of fungi grown on solid media. *Ochrobactrum* sp. delayed mycelial growth during the linear phase. It suggests that this bacterium is capable of synthesizing diffusible toxins against *P. ultimum*. *Ochrobactrum* sp. induced some hyphal damages as well, especially on submerged mycelium of *P. ultimum*. However, this deleterious action had a little effect when this bacterium grew together fungus at the same time. These results suggest that bacterial species found inside the tissue come from rhizosphere during the infection process caused by *P. ultimum* and could interfered with the fungus in its tissue colonization. *In vivo* experiments carried on plant fragments seem to confirm this hypothesis. Finally, an inoculation test is carrying out in the field in order to reproduce symptoms and application of Koch's Postulates.

Number of references: 60

Number of tables: 4

Number of figures: 18

Number of equations: 1

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El brócoli en la Región de Murcia

2.1.1. Generalidades de la planta

El brócoli, bróculi o brécol (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) pertenece a la familia botánica de las Brassicáceas (*Brassicaceae*), anteriormente denominada Crucíferas (*Cruciferae*). El brócoli forma parte del grupo de plantas pertenecientes a la misma especie, pero con diferencias evidentes desde el punto de vista morfológico y alimenticio. Otras variedades de la misma especie son: la coliflor (*B. oleracea* var. *botrytis* L.), repollo (*B. oleracea* var. *viridis* L.), col de Bruselas (*B. oleracea* var. *gemmifera* L.), o el colinabo (*B. oleracea* var. *caulorapa* L.).

Es una planta similar a la coliflor (Fig. 1), aunque las hojas son más estrechas y más erguidas, con peciolo generalmente desnudos, limbos normalmente con los bordes más ondulados; así como nervaduras más marcadas y blancas; pellas claras o ligeramente menores de tamaño, superficie más granulada, y constituyendo conglomerados parciales más o menos cónicos que suelen terminar en este tipo de formación en el ápice, en bastantes casos muy marcada. La raíz es pivotante con raíces secundarias y superficiales. Las flores del brócoli son pequeñas, en forma de cruz de color amarillo y el fruto es una silicua de valvas ligeramente convexas con un solo nervio longitudinal. Produce abundantes semillas redondas y de color rosáceo.

Esta planta posee abundantes cabezas florales carnosas comestibles de color verde, colocadas en forma de árbol, sobre ramas que nacen de un grueso tallo o tallo floral, también comestible. La gran masa de cabezuelas está rodeada de hojas (Fig. 1).

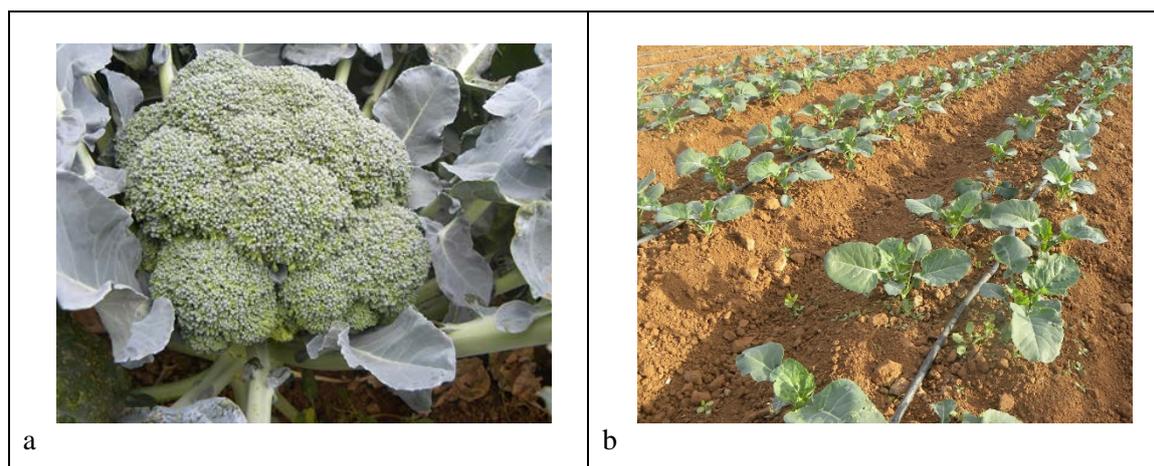


Fig. 1. (a) Aspecto de los tallos florales comestibles y (b) cultivo de brócoli.
Fuente: M.A. Parra, J.A. Martínez (UPCT)

2.1.2. Propiedades y hábitos de consumo

El brócoli tiene un alto valor nutricional y medicinal que radica principalmente en su alto contenido de vitaminas, minerales, carbohidratos y proteínas, por lo que es una hortaliza muy recomendada en la dieta. Estos ayudan a prevenir algunos tipos de cáncer, retardan el proceso de envejecimiento, mejoran el funcionamiento de los pulmones, disminuyen la aparición de cataratas y procesos de degeneración muscular. También disminuyen algunas complicaciones relacionadas con la diabetes. Estas razones justifican el creciente interés en su consumo y cultivo, tanto el producto fresco, congelado o incluso deshidratado (Linares, Brócoli, Ficha 32 UE).

Entre las numerosas propiedades saludables que presenta el brócoli, se encuentra el alto contenido en vitamina C (100 g contienen 89,2 mg de vitamina C; 107% CDR), la presencia de vitamina E y de fibra alimentaria soluble; también contiene múltiples nutrientes con potentes propiedades anti-cancerígenas, como 3,3'-diindolilmetano y pequeñas cantidades de selenio. Tiene los niveles más altos de carotenoides de todas las plantas pertenecientes al género *Brassica*. Es particularmente rico en luteína y contiene β -caroteno.

Una sola ración proporciona más de 30 mg de vitamina C y media taza proporciona 52 mg. El 3,3'-diindolilmetano es un potente modulador de la respuesta del sistema inmunitario innato con actividad antiviral, antibacteriana y anticancerígena. El

brócoli también contiene el compuesto glucorafanina, que puede ser convertido en el compuesto anticancerígeno sulforafano, aunque los beneficios del brócoli se reducen considerablemente si el vegetal es hervido. El brócoli también es una excelente fuente de indol-3-carbinol, un compuesto químico que estimula la reparación del ADN de las células y parece bloquear el crecimiento de las células cancerígenas. Presenta también un alto contenido de ácido fólico en la inflorescencia y en las hojas. El ácido fólico está catalogado como el anticancerígeno más efectivo. Hay estudios que revelan que un elevado consumo de brócoli puede reducir el riesgo de cáncer de próstata agresivo (Kirsh *et al.*, 2007). El consumo de brócoli también puede ayudar a prevenir enfermedades cardíacas (Clout, 2009).

2.1.3. Superficie cultivada

El brócoli es una hortaliza extensamente cultivada en la Región de Murcia. De acuerdo con los datos de estadística agraria ofrecidos por la Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia (www.carm.es), el cultivo del brócoli fue el segundo más extendido en la Región dentro del grupo de hortalizas del 2012, con 11.882 ha, después de la lechuga, con 14.065 ha. En superficie, pero no en producción, superó a cultivos de hortalizas tradicionalmente muy arraigados a la Región, como son el melón, la sandía, el tomate y la alcachofa. Incluso, se llega a constatar, una extensión de cultivos mucho más elevada que la destinada al cultivo de la coliflor (1.101 ha en 2012), cultivo, éste último, que ha gozado de mucha popularidad en nuestra Región.

La superficie cultivada de brócoli en la Región de Murcia va ascendiendo gradualmente con el paso de los años, según se constata de la lectura de la tabla de serie histórica de la distribución regional de cultivos ofrecida por la Comunidad Autónoma (no presentada). De la consulta de esta base de datos, también se constata que la extensión del cultivo del brócoli, desde el año 2005 al 2011, se ha incrementado poco a poco desde 8.998 ha a 10.618 ha, respectivamente, llegando a alcanzar el valor de 10.781 ha en el 2012. Estos registros demuestran un ascenso gradual pero no muy significativo.

2.1.4. Producción

La producción de brócoli ocupa la cuarta posición en cuanto a hortalizas se refiere dentro de la Región de Murcia, con un valor total de 172.496 t en el año 2012, por debajo de cultivos como los de lechuga, melón y tomate. El incremento en producción ha sido progresivo desde el año 2005, sin experimentar altibajos, pero a un ritmo más o menos constante.

Estos datos de superficie y producción reflejan la importancia que está teniendo el cultivo del brócoli en el aumento de la riqueza agrícola de la Región de Murcia, riqueza que va progresivamente en aumento. Se debe tener en cuenta también que Murcia es la principal región productora de esta hortaliza a nivel nacional (INFO, 2012).

2.1.5. Distribución y destino

Una buena parte de la producción de brócoli de la Región de Murcia tiene como destino el mercado exterior, fundamentalmente a países de la Unión Europea. Esta hortaliza fue el producto agroalimentario que más dinero generó de su exportación en el año 2011, después de la lechuga y limón y por delante del vino (165 millones de euros entre brócoli y coliflor) (INFO, 2012).

Según el Informe de “The Fresh Fruit &Vegetables Market in the EU/2006”, el consumo de vegetales frescos en la Unión Europea alcanzó los 62 millones de toneladas durante el 2005 (Linares, Brócoli Ficha 32 UE). Desde el 2001 el consumo de vegetales ha crecido a un ritmo del 1,5% anual. En la Unión Europea, el consumo del brócoli aumentó de 0,5 libras p/c a 5,1 libras p/c, por lo que en los últimos 30 años, el consumo de brócoli aumentó en 920%. El brócoli es el vegetal que más ha incrementado su consumo en los últimos 30 años y dado la tendencia hasta el momento, se espera que su consumo siga aumentando en el futuro. Países como Alemania, España, Italia y Francia son mercados bastante grandes los cuales, en términos generales, se encuentran cerca de la saturación. Polonia es un país que cuenta con gran potencial de mercado, ingresando a segmentos determinados. Países como Ucrania, Hungría y Portugal son otro ejemplo

de mercados con gran potencial por su crecimiento acelerado. Los principales consumidores de brócoli en Europa son Reino Unido (18%) y Alemania, (9,44%).

Unos de los éxitos que está teniendo el consumo del brócoli en la población reside en el estilo de vida y hábitos alimenticios de los europeos, la reducción del tiempo empleado en preparación de alimentos en los hogares. Se consumen menos comidas caseras por el tiempo empleado en su preparación. Por ello, los productos listos para consumir tienen un gran potencial. Dentro de estos productos encontramos congelados, cortados, lavados, cocidos que incurran en menos tiempo. Es por eso, que ensaladas, jugos ya preparados son bien recibidos en la UE.

2.2. Podredumbres blandas de las Brasicáceas. Agentes patológicos implicados

2.2.1. Podredumbres bacterianas

La podredumbre blanda bacteriana ("*bacterial soft rot*" - BSR) es la principal causa de podredumbre en los vegetales (Lund, 1983). Además constituye la causa más frecuente de deterioro bacteriano en los tejidos poco ácidos del brócoli durante su almacenamiento, especialmente en tejidos dañados mecánicamente o por mildiu.

La mayor parte de hortalizas poseen un elevado contenido en agua. La epidermis con la capa cérea, es una barrera importante contra la invasión, pero es delgada y frágil. Así, las plantas se aplastan, se rompen o lesionan fácilmente durante la recolección o transporte, y las bacterias proliferan donde aparecen hojas rotas, provocando podredumbre blanda bacteriana (ICMSF, 1996). A este respecto, suele ser habitual encontrar en la bibliografía estudios sobre BSR asociada a otras alteraciones de tipo fisiológico ya que, en muchas alteraciones de este tipo se destruyen tejidos y en fases avanzadas pueden liberar jugos celulares que son utilizados por las bacterias comensales para su proliferación y posterior descomposición.

Todas las especies patógenas forman parte de una comunidad microbiana normal de la superficie de las hojas (Magnuson *et al.*, 1990), denominados microorganismos comensales. La mayoría son bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas* sp., *Erwinia* sp.,

Serratia sp., *Alcaligenes* sp., *Enterobacter* sp., etc.). Otras son Gram-positivas como *Bacillus* sp. y *Curtobacterium* sp., etc. También levaduras como *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Pichia* sp., *Torulasporea* sp. y *Trichosporon* sp. y hongos filamentosos como *Rhizopus* sp., *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp.

Muchas especies de *Erwinia*, y otras bacterias fitopatógenas, son capaces de producir una serie de enzimas degradativas de las paredes de las células vegetales que actúan sobre la lámina media y los polisacáridos y proteínas, debilitándolas y solubilizándolas, para finalmente causar la ruptura de la célula y su muerte. Estas enzimas son principalmente pectinasas, celulasas, proteasas y fosfolipasas (Chatterjee *et al.*, 1994). En la mayoría de textos esta acción degradativa, que constituye la base del éxito de este tipo de bacterias para colonizar tejidos vegetales, se simplifica con el término pectinolíticas o pectolíticas. Sin embargo, las bacterias que provocan podredumbre, normalmente, no penetran los tejidos intactos, sanos y no dañados, sino que necesitan aberturas naturales como estomas y lenticelas, o heridas en general para entrar a los hospederos (Bartz y Eckert, 1987, citados por Hao y Brackett, 1994). Una vez la bacteria entra en los tejidos internos requiere nutrientes para sobrevivir y crecer.

La podredumbre blanda bacteriana es una enfermedad muy frecuente que se presenta en las plantas hortícolas, acompañada frecuentemente de mal olor, que puede aparecer tanto en campo como en almacén (Noval y Castro, 1987; Escriche *et al.*, 1994). Los tejidos vegetales afectados se descomponen rápidamente en presencia de calor húmedo y cuando disminuye el nivel de O₂, especialmente durante ciertas condiciones de almacenamiento. Los patógenos se propagan especialmente por los espacios intercelulares de los tejidos parenquimatosos. Al desintegrarse la pectina de las paredes celulares, se destruyen las laminillas medias, disolviéndose las uniones celulares (Müller, 1981).

Los síntomas de las podredumbres bacterianas se manifiestan como tejidos acuosos fruto de la descomposición de las células, por la citada actividad pectinolítica de las bacterias aisladas (*Pseudomonas* sp.: *P. cichorii*, *P. marginalis*, *P. viridiflava* (Ryder, 1979; Lund, 1983; Swinburne, 1983; Noval y Castro, 1987; Casanova, 1996; Llácer *et al.*, 1996); *Xanthomonas* sp.: *X. campestris* (Casanova, 1996), *X. campestris* pv. *vitians* (Noval y Castro, 1987; Llácer *et al.*, 1996), *Erwinia* sp.: *E. carotovora*

(Lund, 1983; Casanova, 1996; Hernández *et al.*, 1996); *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Llácer *et al.*, 1996), *E. amylovora* (Hernández *et al.*, 1996), *E. herbicola* (Hernández *et al.*, 1996), y otras especies más raras como: *Pseudomonas cepacia*, *P. gladioli* y *P. aeruginosa*, (Lund, 1983). *Clostridium* sp., *Bacillus* sp. (Hao y Brackett, 1994). Para Jay (1978), la podredumbre blanda bacteriana está causada por *E. carotovora* y varias especies del género *Pseudomonas*, mientras que *Bacillus* sp. y *Clostridium* sp., tienen papeles secundarios. De cualquier manera, una de las bacterias mayoritariamente aislada es *Erwinia carotovora*. Esta especie es estimulada en su crecimiento anaerobio por la presencia de nitratos incorporado a la planta en forma de abono (Jansen y Gorris, 1994). Bajo estas condiciones, la patogenicidad de la bacteria induce actividad respiratoria nitrato-reductasa inhibida por el O₂. Por tanto, el incremento de la fertilización nitrogenada implica una mayor susceptibilidad a las podredumbres blandas bacterianas. Sin embargo, otras especies patógenas como *P. marginalis*, inhibe su desarrollo en presencia de nitratos.

Los factores que favorecen el desarrollo de las podredumbres blandas bacterianas son de tipo intrínseco, es decir, relacionadas directamente con la planta y extrínsecos o relacionados con las condiciones ambientales (Lund, 1983). Entre los factores intrínsecos están: daños mecánicos, estado de madurez de la planta, turgencia de los tejidos, la estructura de las paredes celulares y su vulnerabilidad por las enzimas bacterianas, la concentración en la planta de nutrientes bacterianos y de compuestos antibacterianos y la habilidad de los tejidos de la planta para formar barrera para la infección bacteriana. Entre los factores extrínsecos podemos encontrar la temperatura, la humedad relativa y la humedad libre.

Los síntomas descritos de la bacteriosis tipo podredumbre blanda bacteriana en el brócoli son muy similares a los de su pariente cercano, la coliflor. Las diferencias están fundamentalmente en la elevada diferencia de color que presentan las pellas de las dos plantas, lo que se traduce en una coloración diferente de los tejidos afectados. La sintomatología de la bacteriosis de la pella de la coliflor ha sido descrita por Martínez *et al.* (2003b). La sintomatología de las podredumbres bacterianas sobre la inflorescencia o pella de la coliflor está bien caracterizada; se manifiesta en forma de pequeñas manchas incoloras que palidecen rápidamente hasta cubrir toda la pella aunque, generalmente, quedan circunscritas a un florete de la misma. Estas pequeñas manchas

tienen su origen en un colapso acuoso de una pequeña porción de tejido seguido de su ablandamiento por maceración que se extiende rápidamente a los tejidos adyacentes si las condiciones ambientales son favorables (Lund, 1983). Como se ha mencionado anteriormente, la colonización de estos tejidos por bacterias fitopatógenas va acompañada rápidamente por la proliferación de bacterias saprofitas que contribuyen de forma decisiva en el desarrollo y síntomas de la alteración (Jay, 1978; Lund, 1983; Andrés-Yeves *et al.*, 1991), enmascarando a la verdadera bacteria patógena, además son las responsables del olor nauseabundo (Noval y Castro, 1987). La podredumbre suele aparecer en períodos de elevada humedad y temperaturas suaves (Arsenijevic, 1990).

La podredumbre blanda bacteriana en el brócoli se caracteriza por presentar un aspecto de tipo blando que forma puntos acuosos que maceran el tejido vegetal, suele iniciarse en la superficie de la pella (Fig. 2a), o en la zona del cuello de la planta (Fig. 2b), donde puede pudrir todo el tallo. Le acompaña un olor desagradable debido a la proliferación de bacterias saprófitas sobre los tejidos macerados. Por la sintomatología, es sencillo identificar la enfermedad en campo o almacén, pero para identificar la especie bacteriana causante de la enfermedad hay que recurrir a pruebas serológicas de campo (kits de identificación rápida) o técnicas serológicas o genéticas de laboratorio.

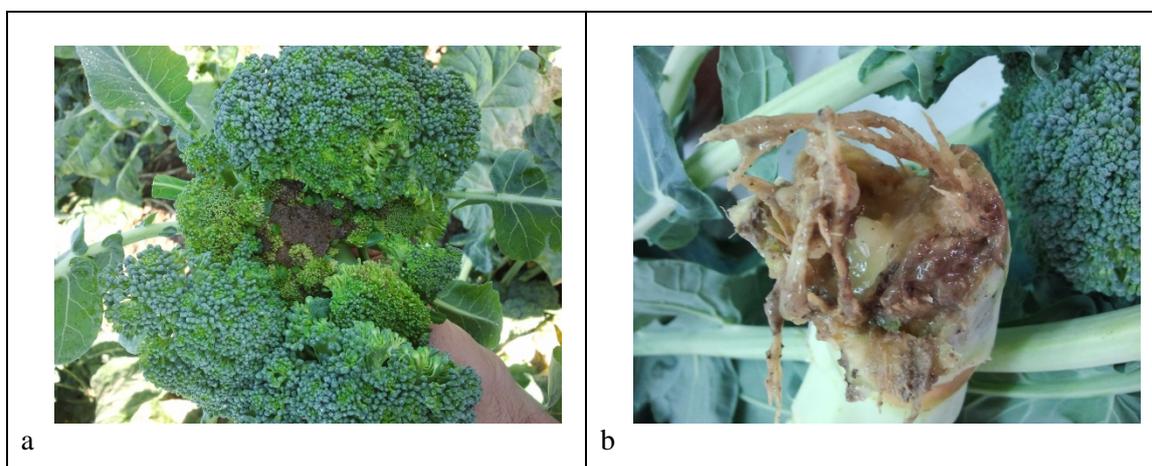


Fig. 2. (a) Síntomas sobre la superficie de la pella de la podredumbre blanda bacteriana en brócoli. (b) Síntomas sobre el área del cuello – tallo floral.

Fuente: A. Ibarra (SAKATA SEED IBÉRICA)

Aunque, como se ha visto anteriormente, la podredumbre blanda bacteriana se ha descrito en numerosas especies de plantas hortícolas y ornamentales, incluido el brócoli, está documentado que está causada fundamentalmente por especies de *Erwinia*

(*E. carotovora* subsp. *carotovora* – Ecc o *E. carotovora* subsp. *atroseptica* - Eca) y por especies de *Pseudomonas* pertenecientes al grupo pectinolítico (*Pseudomonas marginalis* y *P. viridiflava*). Estas bacterias sólo son capaces de producir enfermedad en tejidos senescentes, estresados o dañados. Por ello, es más habitual encontrarlas durante la conservación y comercialización que en el cultivo (Liao, 2006).

2.2.2.- Podredumbre blanda acuosa o podredumbre blanca ocasionada por *Sclerotinia* sp.

Aunque hay otros hongos u organismos cromistas afines, además de *Sclerotinia* sp., que causan podredumbres acuosas, como *Pythium* sp. y *Phytophthora* sp., entre otros, este género fúngico es uno de los representantes más habituales como agente causal de podredumbres blandas de origen fúngico. De hecho, la podredumbre ocasionada por los representantes de este género se denominan genéricamente “*watery soft rot*” – podredumbre blanda acuosa (Snowdon, 1990; 1991).

El hongo *Sclerotinia* es un patógeno propio del suelo que ataca a diversas especies hortícolas, incluidas algunas malas hierbas. Se identifica a *Sclerotinia sclerotiorum* como el agente causal en las Crucíferas (Brasicáceas).

S. sclerotiorum, es un hongo ascomiceto, fitopatógeno, que causa enfermedades en forma de podredumbres y marchitez. El desarrollo de la enfermedad suele empezar normalmente en el cuello de las plantas o en el sistema radicular (Figs. 3a y 3b), desde ahí puede progresar hacia el resto de los órganos de la planta como son el tallo, hojas o cogollo prefloral. Utiliza las heridas de la planta para colonizar a la misma, y una vez que afecta a una planta, en ella se puede ver unas decoloraciones rosáceas sobre el tejido húmedo. Posteriormente se empieza a formar una gran cantidad de micelio blanquecino. Más tarde entre el micelio se encuentran las estructuras de multiplicación del hongo, conocidas como esclerocios, que son partículas duras de color negro o marrón oscuro las cuales tienen un tamaño de entre 0,2 y 1 cm (Fig. 3c).

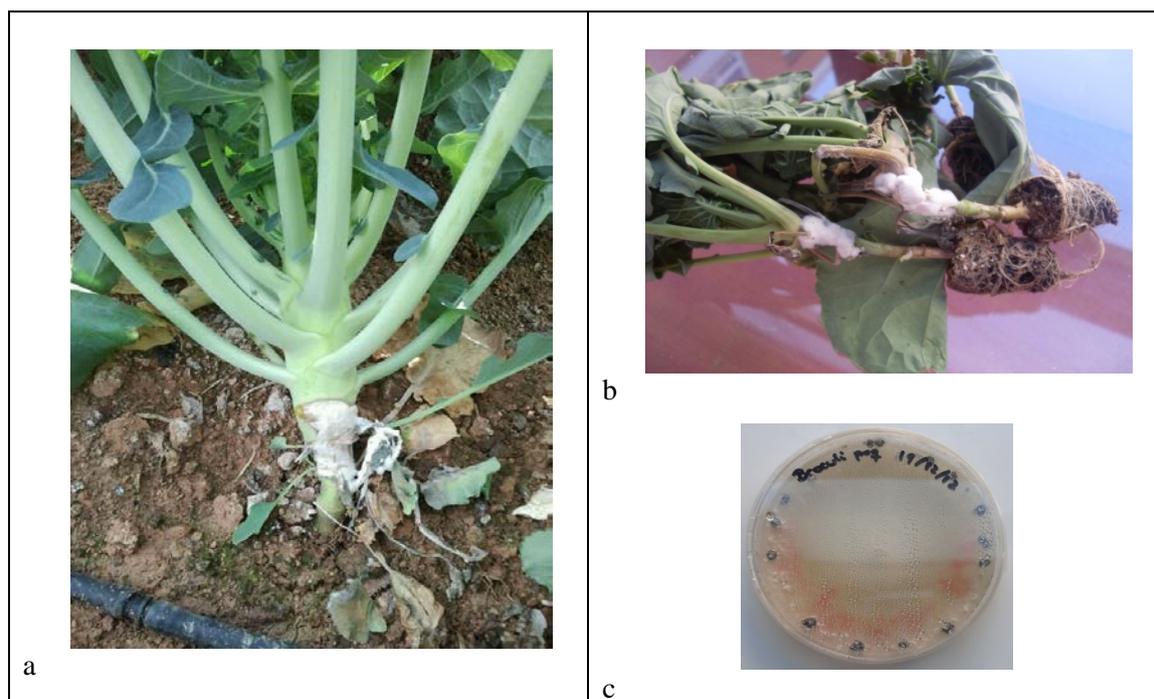


Fig. 3. (a) Síntomas de enfermedad por *Sclerotinia* en el área del cuello de la planta de brócoli. (b) Síntomas de la misma enfermedad sobre plántulas de la misma especie. (c) Los análisis de laboratorio pusieron de manifiesto que la especie de *Sclerotinia* aislada de las plántulas en (b), se trata de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Fuente: (a) A. Ibarra (SAKATA SEED IBÉRICA); (b), (c) M.A. Parra y J.A. Martínez (UPCT)

2.2.3. Establecimiento de una hipótesis para dilucidar la etiología de la podredumbre blanda del tallo

La podredumbre blanda del tallo del brócoli como sintomatología o nombre de la enfermedad no está documentada como tal. A nuestro conocimiento, esta enfermedad o, mejor dicho, los síntomas que manifiesta en los cultivos de brócoli, se atribuyen comúnmente a una podredumbre blanda bacteriana que afecta solamente a la parte del tallo y no a las florecillas (Fig. 2b). Esta asociación puede ser debida a que visualmente presenta los típicos síntomas de una bacteriosis de tipo blando, es decir, una descomposición acuosa del tejido acompañado de cierto pardeamiento de éste. Sin embargo, la podredumbre blanda bacteriana en el brócoli, durante su cultivo, se presenta generalmente sobre la pella (Fig. 2a). Esta podredumbre bacteriana, con los síntomas definidos en la Fig. 2, es común en col china durante su cultivo y puede ser encontrada esporádicamente sobre el brócoli. En otras Brassicáceas es más habitual su desarrollo durante el almacenamiento y transporte.

La sintomatología que pretendemos definir en este trabajo y que hemos denominado genéricamente “podredumbre blanda del tallo del brócoli” se manifiesta por una descomposición acuosa de la médula de las piezas afectadas (Figs. 4a y 4b). Inicialmente, el anillo vascular aparece pardeado y el tejido de la médula está descompuesto (Fig. 4a). Posteriormente el tejido pardea completamente y la descomposición del tejido está más acentuada (Fig. 4b). Externamente esta enfermedad puede pasar desapercibida, ya que las hojas de la planta dificultan la visión de la tonalidad parda que puede presentarse a veces sobre el tallo (Fig. 5), especialmente en la zona basal, quizás debido a la interacción de otros patógenos justo en la zona del cuello. En este punto se puede confundir con otras enfermedades, como pueden ser la podredumbre blanda acuosa ocasionada por *Sclerotinia* o los síntomas ocasionados por el hongo *Verticillium dahliae*, que causa un pardeamiento similar del anillo vascular. La médula del tallo floral va perdiendo su consistencia poco a poco e inicialmente hemos observado, en alguna pieza afectada, que puede presentarse un anillo irregular de color pardo (Fig. 6). En el tejido más afectado la pérdida de consistencia está generalizada y la coloración es verdosa, acompañada de ciertas tonalidades pardas (Fig. 4).

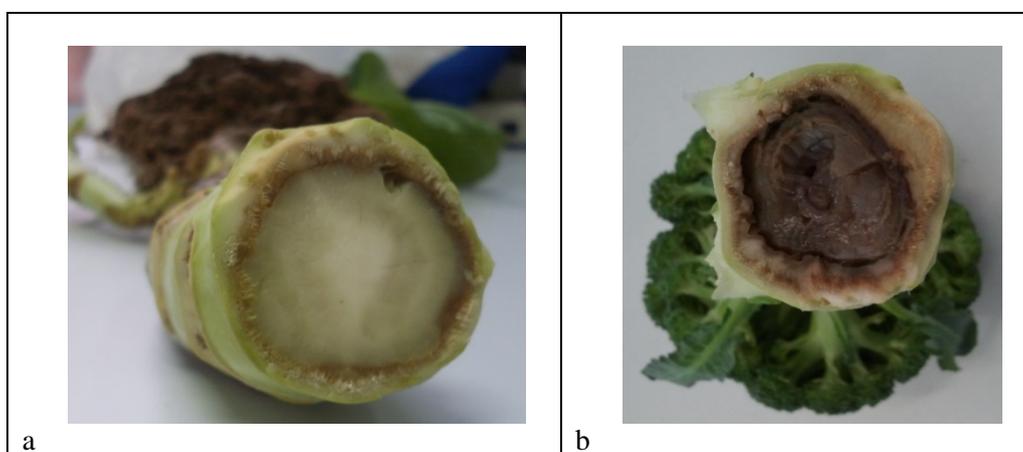


Fig. 4. Síntomas internos de la podredumbre del tallo del brócoli. (a) Aspecto incipiente (médula macerada y anillo pardo). (b) Síntoma avanzado. Médula totalmente descompuesta, parda y anillo pardo bajo la corteza del tallo floral.



Fig. 5. Pieza del tallo floral que presentaba maceración de la médula en toda su sección, desde el cuello hasta la zona de corte. Adicionalmente se observa un pardeamiento exterior en su sección intermedia.



Fig. 6. Anillo irregular de color pardo observado en estadios no muy avanzados de la podredumbre presuntamente provocada por *Pythium ultimum* en la médula del brócoli.

Como se ha mencionado anteriormente, aun observando el interior del tallo floral afectado de descomposición acuosa, esta enfermedad, al parecer de poca incidencia, puede ser confundida y asociada corrientemente a una podredumbre blanda bacteriana por la consistencia blanda y la carencia de micelio fúngico en las condiciones que hemos observado. Como se ha explicado en apartados anteriores, la podredumbre bacteriana es una bacteriosis muy habitual de las hortalizas como apio, lechuga, coliflor, col, col china, coles de bruselas espinaca, zanahoria, etc. (Bartz y Eckert, 1987; Snowdon, 1991). Afecta especialmente a los tejidos senescentes, dañados y debilitados, por lo que es habitual durante el almacenamiento de estos productos. En brócoli es menos común y se manifiesta por una descomposición acuosa y parda-grisácea del

tejido de la pella (Fig. 2). Como se ha documentado anteriormente, esta enfermedad puede estar causada por diversas especies bacterianas: *Bacillus polymyxa*, *B. pumilus*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas cichorii*, *P. syringae*, *P. marginalis*, *P. viridiflava* (Snowdon, 1991). En brócoli se ha establecido, como agentes causales, las especies bacterianas de los géneros *Erwinia* y *Pseudomonas* (www.postharvest.ucdavis.edu). Sin embargo, Hildebrand (1989) y Canaday (1992) aislaron una amplia variedad de bacterias fitopatógenas de la podredumbre blanda bacteriana de la pella del brócoli; entre ellas, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, varios biovares de *P. fluorescens*, *P. viridiflava* y *E. carotovora*. Estas bacterias se encuentran formando parte de la comunidad microbiana superficial de las plantas y necesitan tejidos dañados para penetrar al interior y provocar la enfermedad. Sin embargo, la infección de piezas no dañadas es provocada por otras bacterias que producen viscosina; una sustancia surfactante que altera la permeabilidad de la membrana celular de los tejidos cerosos del brócoli que tiene como resultado el incremento de la pérdida de solutos y un ataque por bacterias de podredumbres blandas (cepas pectolíticas o pectinolíticas de *Pseudomonas* del grupo fluorescente como, por ejemplo, *P. viridiflava*, *P. marginalis* - *P. fluorescens*). A partir de este momento, cualquier bacteria fitopatógena o no, adaptada a crecer en este ambiente puede proliferar produciendo la colonización de los tejidos. Si la planta tiene abundancia de abonado nitrogenado, la colonización puede ser provocada por *Erwinia carotovora* debido a que en los ambientes pobres en O₂, que se forma en el interior de los tejidos afectados, esta bacteria puede utilizar los nitratos como aceptor final de electrones (respiración anaerobia) (Smid *et al.*, 1994).

Hasta el momento, *Pythium* sp. se ha descrito en las Brasicáceas como patógeno de plántulas que causa los síntomas definidos como ahogamiento o marchitamiento, también denominado “*damping-off*”, en la literatura anglosajona e, incluso, este hongo puede provocar podredumbre de las raíces de plantas adultas (Sedki y El-Mohamedy, 2012). Aunque Kubota *et al.* (1995), reportaron por primera vez la podredumbre del tallo del brócoli causada por *P. ultimum* en Japón, la sintomatología que detallan no coincide exactamente con la enfermedad descrita en este trabajo. Estos autores describen una enfermedad caracterizada por una podredumbre del tallo de consistencia acuosa con la superficie blanquecina debido el desarrollo del micelio fúngico. De acuerdo con estos investigadores, esta era la primera vez que se reportaba a *P. ultimum* como causante de enfermedad en el tallo del brócoli en ese país. Tras una revisión

bibliográfica, se ha comprobado que *Pythium* sp. ha sido descrito también como agente causante de enfermedad en cabezas formadas de coles sobre hojas y tallo, con síntomas similares a los definidos por la podredumbre blanda en estos cultivos, tanto en EE.UU. (Drechsler, 1925), como en Egipto (El-Mohamedy y El-Mougy, 2009). De todo ello se desprende que *Pythium* sp. podría afectar también a las raíces y tallos de Brassicáceas, pero no está documentado en España (Melgarejo *et al.*, 2010).

No hay datos sobre la incidencia de esta sintomatología. Probablemente porque se asocia, como se ha mencionado anteriormente, a una podredumbre blanda bacteriana. Por tanto, la realización de estimaciones en estos momentos es una tarea a todos modos imposible. Ni siquiera hay datos de podredumbre bacteriana desarrollada en piezas durante el cultivo. No obstante, nuestra experiencia sitúa a esta sintomatología como de incidencia esporádica, pero quizás no infrecuente, debido a que puede pasar desapercibida durante el cultivo. Sólo se aprecia en el momento de la cosecha, si el desarrollo es avanzado. Sin embargo, como problemas sanitarios del brócoli, sólo se habla principalmente de mildiu, ocasionado por *Peronospora parasitica*, enfermedad de mayor incidencia en el norte de España que en el sureste y de alternariosis o negrón, enfermedad causada por hongos del género *Alternaria*, principalmente por *A. brassicicola* (alternariosis) y que constituye un gravísimo problema del cultivo. Como tercer segmento se habla de un segmento donde se incluye a *Pythium*, causante del “*damping-off*” en los semilleros. Sin embargo, éste es un problema menor y tiene importancia sólo en los semilleros. En estos momentos no podríamos valorar la incidencia de *P. ultimum* en campo porque, por un lado, no se asocia esta enfermedad a este hongo y, por otro lado, sólo se han detectado daños aislados y en algunas plantas que pasan desapercibidas hasta ahora, por ser un daño interno donde aparentemente no manifiesta síntomas externos y, cuando los manifiesta, sólo lo hace en la parte menos visible de la planta. Sin embargo, hay que considerar que las condiciones ambientales podrían hacer que en alguna futura campaña esta enfermedad tuviera una incidencia notable. Evidentemente, su correcta identificación es esencial para la sanidad de este cultivo, previniendo su aparición y propagación.

La podredumbre blanda acuosa causada por *Sclerotinia*, fue reportada por primera vez durante la pasada campaña en la zona del Levante, como causante de graves daños en brócoli. Los síntomas ocasionados por esta enfermedad en el tallo del

brócoli son similares a los síntomas que hemos encontrado en las piezas afectadas que hemos examinado. Sin embargo, se trata de un hongo que, años atrás, no manifestaba problemas en brócoli pero durante este año ha dado grandes problemas en algunas fincas. Los ataques por *Sclerotinia* pueden pasar desapercibidos en una primera instancia, por lo que sólo se observa la pudrición acuosa final en tallo y quizás podría confundirse con la sintomatología descrita en este trabajo si no se ha desarrollado el micelio sobre la planta, ya que en el caso de que apareciera, el micelio de *Sclerotinia* es más consistente (denso) que el de *Pythium*. Sin embargo, cuando un cultivo tiene daños patentes por *Sclerotinia*, estos son más fáciles de detectar en fases avanzadas de desarrollo del hongo porque, o bien se ve el abundante micelio blanquecino sobre la base del tallo o bien, la planta se debilita y las hojas pierden su consistencia. Finalmente se producen los esclerocios.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento de microorganismos de tejidos sintomáticos

Las pellas de brócoli maduras con el síndrome definido anteriormente fueron suministradas por el especialista en técnicas de cultivo de SAKATA SEED IBÉRICA, Antonio Ibarra, al Laboratorio de Fitopatología del Grupo Protección de Cultivos de la UPCT a finales de noviembre de 2012 y a mediados de diciembre del mismo año. Las piezas procedían de cultivos de la Región de Murcia.

Tras el estado de la investigación realizado hasta el momento, aún no tenemos claro el papel que desempeñan los microorganismos aislados en varias muestras que han presentado los síntomas descritos durante la pasada campaña. Una hipótesis plasmada en el apartado 2.3.3., como consecuencia de los estudios que hemos realizado hasta el momento, pueden sugerir que la enfermedad podría ser iniciada por *P. ultimum* y posteriormente los tejidos afectados son colonizados por bacterias saprófitas procedentes de la rizosfera o del filoplano a partir del punto de infección. Con el fin de aislar y clasificar a los microorganismos obtenidos del interior de los tejidos afectados, se procedió con la metodología descrita en los siguientes párrafos. Se obtuvo un total de siete aislados morfológicos distintos, dos de ellos asociados al tejido del margen de la podredumbre, junto con *Pythium ultimum*, que estaba presente tanto en este tejido,

como en el tejido macerado. Se descartaron los aislados bacterianos que no dieron positiva la prueba pectinolítica de la patata y que se encontraban presentes solamente en el tejido macerado por considerarse bacterias exclusivamente saprófitas que debían de provenir de las poblaciones comensales de la superficie de los tejidos (filoplano y rizoplano) y entraron por la abertura abierta por el patógeno o bien por heridas del tallo. No obstante, como se verá más adelante estas comunidades pueden interferir directamente con el patógeno en el proceso de colonización de los tejidos del hospedero.

Para realizar los aislamientos, se procedió del siguiente modo:

- 1.- Examen visual de los tallos, distinguiendo y marcando las áreas donde se manifestaba la sintomatología descrita anteriormente.
- 2.- Examen de las áreas definidas bajo aumento con el uso de microscopio estereoscópico o lupa binocular con el fin de detectar la posible presencia de signos de microorganismos.
- 3.- Toma de muestras de áreas afectadas en 2) para su observación bajo el microscopio óptico con el propósito de visualizar estructuras identificativas de microorganismos en el caso de que las hubiere
- 4.- Lavado del tallo floral con agua de abastecimiento con el fin de eliminar una buena parte de la comunidad microbiana presente en la superficie de la planta.
- 5.- Desinfección de la zona superficial de la corteza afectada con una mezcla comercial de lejía y detergente diluida al 20% (v/v) en agua destilada. Dejando actuar la mezcla durante unos 5 min.
- 6.- Desinfección con etanol reactivo 96% (v/v) aplicado por pulverización.
- 7.- Lavado con agua destilada esterilizada en la zona afectada para eliminar los residuos de desinfectantes.

8.- Corte aséptico de una sección cuadrada con un bisturí flameado hasta poner al descubierto la porción de la médula situada inmediatamente bajo la piel. Este paso se realizó en diferentes secciones a lo largo de todo el tallo floral.

9.- Toma de fragmentos de médula de forma aséptica para sembrarlos sobre medio de cultivo sintético de agar de patata y dextrosa (PDA) de Scharlab® (Barcelona) y en agar de recuento total (PCA) de Scharlab®. El aislamiento en PDA se utilizó para favorecer el desarrollo de los hongos sobre el de las bacterias, mientras que en PCA crecen con facilidad las bacterias aunque también lo hacen los hongos.

Las condiciones de incubación del medio de cultivo inoculado fueron de 5 días a 26°C en una incubadora SANYO (CFC FREE), modelo MIR-153, dotada de ventilador para la distribución homogénea de la temperatura en todo el recinto.

3.2. Identificación de microorganismos

3.2.1. Caracteres fenotípicos de los aislados bacterianos

El análisis de las bacterias se realizó tras la siembra de los primeros aislados de los tejidos de tallos de brócoli afectados en PCA y posteriormente realizando subcultivos por medio de la técnica del agotamiento del asa con el fin de aislar colonias que provinieran de una única o un grupo reducido de bacterias (unidad formadora de colonia). Los diferentes aislados morfológicos se clasificaron de acuerdo con el color, morfología, elevación, contorno y otros caracteres relacionados con su consistencia y se codificaron como aislados propios para realizarles distintas pruebas de identificación. Posteriormente se volvieron a purificar realizando agotamientos del asa de cada uno de ellos. La temperatura de incubación siempre fue de 26°C. A estos aislados se les realizaron diferentes pruebas fenotípicas encaminadas a detectar la presencia de bacterias pectinolíticas que pudieran estar relacionadas directamente con la enfermedad. Por ello, se les realizó la tinción de Gram y las pruebas de actividad pectinolítica de la patata, metabolismo de la glucosa en medio de cultivo O/F o Hugh-Leifson y prueba de producción de pioverdinas o pigmentos fluorescentes bajo luz UV en medio de cultivo

B de king. Estas pruebas se realizaron de acuerdo con los métodos descritos por Andrés-Yeves *et al.* (1991).

3.2.2. Caracteres fenotípicos del aislado de *Pythium ultimum*

Se tomaron muestras del interior del tejido de la médula de todas las piezas afectadas, tanto del área macerada, como de la parte adyacente, junto a los haces vasculares. Las muestras se observaron en el microscopio óptico Olympus BX50, modelo BX50F4 y se fotografiaron con la cámara Olympus SC20.

Se anotaron las características del micelio (hialino, tabicado o cenocítico, presencia de vesículas de lípidos, etc.). La formación de las estructuras de reproducción, espogangios, anteridios, oogonios y oosporas requiere de medios de cultivo y aditivos específicos.

3.2.3. Identificación de los aislados bacterianos mediante secuenciación del ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S)

3.2.3.1. Aislados y condiciones de cultivo

Los aislados bacterianos que se obtuvieron del tejido interno de la médula adyacente al tejido macerado se seleccionaron para la identificación a nivel de especie. De los siete aislados morfológicos que se obtuvieron, dos de ellos, los marcados como A y C, fueron detectados que presentaban actividad pectinolítica (Tabla 3), mientras que los aislados F y G se obtuvieron del tejido adyacente al tejido macerado. Se procedió a identificar estos dos últimos aislados a nivel de especie por ser candidatos a ser patógenos. Para ello, se cultivaron en placas de Petri con el medio de cultivo PCA (agar de recuento total). De cada uno de ellos se hicieron dos subcultivos identificados como: F-1, F-2, G-1, G-2 y se incubaron a 26°C durante 2 días.

3.2.3.2. Extracción del ADN genómico

Para la extracción del ADN se empleó el kit E.Z.N.A. Bacterial DNA (Omega bio-tek) y el protocolo empleado fue el de centrifugación. Cada colonia bacteriana se cogió con un émbolo esterilizado y depositó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL con 500 μL de agua libre de nucleasa (Invitrogen) estéril. Posteriormente se centrifugó a 4.000 g durante 10 min. Hecho esto, se siguió las instrucciones del protocolo del kit de extracción.

El ADN se eluyó en agua libre de nucleasa estéril y se midió su concentración en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El ADN se guardó a -20°C hasta su uso.

3.2.3.3. Amplificación PCR y secuenciación

El volumen total de la amplificación PCR (Reacción de la Polimerasa en Cadena) fue de 25 μL . Empleándose 2 μL de ADN (100 ng/ μL), 0,25 μL of BiotaqTM ADN Polimerasa 5 U μL^{-1} (Bioline) y 2,5 μL de cada primer (10 μM).

Los “*primers*” usados para la amplificación del gen ADNr 16S fueron los descritos por Weisburg *et al.* (1991):

rD1: 5' AAGGAGGTGATCCAGCC (reverso)

fD1: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (directo).

Las condiciones térmicas de la PCR fueron: desnaturalización inicial de 5 min. a 95°C , seguido por 35 ciclos (1 min. 95°C , 1 min. 60°C y 1.30 min 72°C), y una extensión final de 7 min. a 72°C (MyCycler thermal cycler, BioRad).

Los productos PCR fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa 1.5 % / TBE 1X después de 10 min en una tinción con bromuro de etidio.

La banda de ADN obtenida (~1.500 pb) fue purificada siguiendo las instrucciones del kit Pure Link Quick Gel Extraction and PCR Combo kit DNA

(Invitrogen) y secuenciada en el Servicio de Secuenciación SECUGEN de Madrid (www.secugen.es).

3.2.4. Identificación de *Pythium ultimum* mediante secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal (ADNr ITS)

3.2.4.1. Aislados y condiciones de cultivo

A partir de los aislados fúngicos que se obtuvieron directamente del área comprendida entre el tejido dañado de la médula y área aparentemente intacta por debajo del tejido cortical del tallo, se hicieron subcultivos sucesivos en PDA (agar de patata y dextrosa, Scharlab[®], Barcelona) a partir de pequeños fragmentos de micelio con el fin de purificar el aislado inicial. Se partió de dos pellas afectadas con los mismos síntomas; por tanto, se obtuvieron dos aislados que se codificaron como O-1 y O-2. De cada aislado se hicieron 2 subcultivos; O-1.1, O-1.2 y O-2.1, O-2.1 Las condiciones de crecimiento de los aislados y se incubaron a 26°C durante 2 días.

3.2.4.2. Extracción del ADN genómico

El ADN se extrajo según el protocolo descrito por Cenis en 1992, dicho protocolo emplea tampón Raeder & Broda y se eluyó en agua libre de nucleasa estéril (Invitrogen) y se midió su concentración en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El ADN se guardó a -20°C hasta su uso.

3.2.4.3. Amplificación PCR y secuenciación

Los “*primers*” empleados para amplificar los espacios de transcripción interna del ADN ribosomal (ADNr ITS – “*Internal Transcribed Spacers*”) fueron (White *et al.*, 1990):

its 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)

its 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)

En la reacción PCR se usó 4,0 μL de ADN (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 0,3 μL de Biotaq™ DNA Polymerase 5 U μL^{-1} (Bioline) y 2,4 μL de cada “*primer*” (5 μM) en un volumen total de reacción de 25 μL . Las condiciones térmicas de la PCR fueron: desnaturalización inicial 5 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 56°C y 1,5 min a 72°C. Finalmente una etapa de extensión de 7 min a 72°C (MyCycler thermal cycler, BioRad). Los productos PCR fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa 1,5 % / TBE 1X con 10 μL de bromuro de etidio (1/10).

La banda de ADN obtenida (~ 800 pb) fue purificada siguiendo las instrucciones del kit Pure Link Quick Gel Extraction and PCR Combo kit DNA (Invitrogen) y secuenciada en el Servicio de Secuenciación SECUGEN de Madrid (www.secugen.es).

Tanto los aislados bacterianos como el aislado de *Pythium ultimum* son repicados cada mes en PCA y PDA respectivamente, y mantenidos en refrigeración a 9°C. No obstante, dada la importancia del asilado de *P. ultimum* para el establecimiento de una nueva enfermedad, se han enviado dos subcultivos a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de Valencia para proponer su aceptación en depósito público. La CECT comprobó la viabilidad, pureza y autenticidad del aislado y aceptó su depósito. El aislado ha pasado a definir una cepa con el siguiente código: CECT 20902, con fecha 28 de mayo de 2014, depositada a nombre de: Juan Antonio Martínez López, María Ángeles Parra Sáez y Antonio Ibarra Bravo.

3.3. Pruebas de confrontación *in vitro* entre microorganismos

Con el fin de comprobar la interacción que presentaban las bacterias aisladas del tejido adyacente a los síntomas de la enfermedad con *Pythium ultimum*, se procedió a realizar una serie de ensayos de confrontación dual en dos medios de cultivo diferentes: PDA – agar de patata y dextrosa, Scharlab®, Barcelona y PCA – agar de recuento total, Scharlab®. Se utilizó PDA, un medio de cultivo más apropiado para el crecimiento de hongos por su pH ácido (5,5) para favorecer el crecimiento del hongo en su interacción con las bacterias. Por el contrario, se utilizó PCA, un medio de cultivo donde pueden crecer tanto bacterias aerobias como hongos por su pH neutro (7,0), con el fin de favorecer el crecimiento de las bacterias confrontadas con *P. ultimum*.

Los experimentos diseñados en esta sección se realizaron a partir de siembras de *P. ultimum*, *Ochrobactrum* sp. y *Pseudomonas putida* de 3 días de duración. Para ello, se realizaron subcultivos por cada uno de los tres microorganismos sobre PDA.

La experiencia comenzó el día 12 de diciembre de 2013. Los tratamientos realizados de confrontación dual, tanto en PDA como en PCA, se esquematizan en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos definidos para las pruebas de confrontación dual en PDA y en PCA de diversos aislados de bacterias frente a *Pythium ultimum*.

TRATAMIENTO	FECHA Y MICROORGANISMO PRIMERA SIEMBRA
Testigo (<i>Pythium ultimum</i>)	16/12/2013 - <i>P. ultimum</i>
<i>P. ultimum</i> + <i>Ochrobactrum</i> sp.	12/12/2013 - <i>Ochrobactrum</i> sp.
<i>P. ultimum</i> + <i>P. putida</i>	12/12/2013 - <i>P. putida</i>
<i>P. ultimum</i> + <i>Ochrobactrum</i> sp. + <i>Pseudomonas putida</i>	12/12/2013 - <i>Ochrobactrum</i> sp. + <i>Pseudomonas putida</i>

Las siembras del hongo se realizaron colocando un pequeño fragmento de micelio del subcultivo de aproximadamente de 5 x 5 mm. de tamaño en el extremo de una placa con medio de cultivo PDA o PCA. Las bacterias se sembraron realizando una estría en el extremo opuesto de la placa de cultivo.

Las líneas de siembra de las bacterias se realizaron 4 días antes que la siembra del hongo en las mismas placas, debido a que el hongo presentaba una alta velocidad de crecimiento y es necesario que la bacteria se desarrolle plenamente en su fase exponencial de crecimiento para darle tiempo a que puedan difundir las sustancias inhibitoras del crecimiento, en el caso de que las presentara, antes de que el micelio del hongo alcance a la línea de siembra de la bacteria.

Se hicieron 4 placas por tratamiento y la temperatura de incubación fue de 26°C.

El objetivo perseguido con la realización de este diseño se basó en detectar y valorar la interacción entre las bacterias aisladas y *P. ultimum* cuando crecieron

confrontados en medio de cultivo sintético. Esta técnica permite poner de manifiesto la posible existencia de antagonismo o sinergismo entre las bacterias y el aislado de *P. ultimum* obtenido por medio de la caracterización de la tasa de crecimiento del hongo y de otras variables estudiadas. Esta técnica también permite poner de manifiesto la posible producción de sustancias inhibitorias de crecimiento sobre el hongo y, con la ayuda de la microscopía, conocer los daños morfológicos que las bacterias podrían ocasionar al hongo.

La definición de las variables utilizadas así como sus unidades de medida se detallan a continuación:

Área de crecimiento de la colonia (cm²). Representa el área de la colonia desarrollada medida a intervalos diarios sobre la misma colonia (medidas repetidas). Esta medida se realiza generalmente como el diámetro de la colonia, pero consideramos que el diámetro de una colonia no caracteriza totalmente el crecimiento en los casos en los que la colonia no tiene un hábito de crecimiento totalmente circular. La medición del área de la colonia se realizó, previa calibración con el diámetro de la placa Petri, con fotografía digital de ésta y posterior análisis en el software Image Tool for Windows, versión 3.0 (Texas, EE.UU.).

Tasa de crecimiento (cm²/día). Es el grado (velocidad) de crecimiento del hongo cuando se desarrolla en un medio de cultivo sólido. La fase lineal de crecimiento es la fase en la que el hongo crece a pleno rendimiento una vez ha pasado la fase exponencial que suele durar solamente unas pocas horas y antes de entrar en la fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento disminuye.

Esta variable se mide como la pendiente de la recta obtenida en un intervalo de crecimiento en función del tiempo. Cuando el hongo no está en la fase lineal de crecimiento, se debe tomar el intervalo de tiempo lo suficientemente corto para poder ajustar una recta. También se puede obtener la tasa de crecimiento aplicando la ecuación 1 (procedimiento utilizado en este trabajo):

$$\mu \text{ (cm}^2\text{/día)} = \frac{A_{(t+1)} - A_t}{(t+1) - t} \quad (1)$$

donde,

μ : Tasa de crecimiento ($\text{cm}^2/\text{día}$),

$A_{(t+1)}$: Área de la colonia un día determinado (cm^2),

A_t : Área de la colonia el día anterior o días anteriores considerados a $t + 1$ (cm^2),

$t + 1$: Un día determinado (días) y,

t : El día anterior considerado a $t + 1$ (días).

Duración de la fase lineal (días). Esta variable representa los días transcurridos entre el final de la fase exponencial (generalmente la fase de latencia, ya que la fase exponencial suele pasar desapercibida, debido a que dura muy pocas horas) y el inicio de la fase estacionaria o de deceleración. Se obtiene a partir de los gráficos tiempo – área, detectando la zona lineal visualmente en el gráfico.

El tratamiento de resultados se realizó para cada variable por medio del cálculo de la media aritmética de las repeticiones de cada tratamiento como la estimación del valor medido y la medida del error, o desviación estándar, como la estimación de la precisión. Dado el número de repeticiones por tratamiento, el valor medio de la variable y su desviación estándar, el lector está en condiciones de construir los intervalos de confianza del valor de media para valorar la separación de medias entre tratamientos (Miller y Miller, 1993). Los resultados se presentaron por medio de gráficos cartesianos del valor de la variable en función del tiempo. Se trata pues de un set de medidas repetidas a intervalos diarios realizadas sobre las mismas unidades experimentales (placa de Petri conteniendo las bacterias y hongos confrontados).

3.4. Crecimiento *in vitro* de una población mixta de microorganismos

El experimento diseñado en esta sección se realizó a partir de siembras de *P. ultimum*, *Ochrobactrum* sp. (aislado G) y *Pseudomonas putida* (aislado F) de 3 días de duración. Para ello, se realizaron subcultivos por cada uno de los tres microorganismos sobre PDA el día 17 de enero de 2014 y el día 20 se procedió a realizar las siguientes siembras que definieron los tratamientos reflejados en la Tabla 2.

Tabla 2. Tratamientos definidos para comprobar el efecto de diversos aislados de bacterias sobre el crecimiento de *Pythium ultimum* creciendo conjuntamente.

TRATAMIENTO	FECHA Y MICROORGANISMO PRIMERA SIEMBRA	FECHA Y MICROORGANISMO SEGUNDA SIEMBRA
Testigo (<i>Pythium ultimum</i>)	20/01/2014 - <i>P. ultimum</i>	-
<i>P. ultimum</i> + <i>Ochrobactrum</i> sp.	20/01/2014 - <i>P. ultimum</i> + <i>Ochrobactrum</i> sp.	-
<i>P. ultimum</i> + <i>P. putida</i>	20/01/2014 - <i>P. ultimum</i> + <i>P.</i> <i>putida</i>	-
<i>Ochrobactrum</i> sp. – <i>P.</i> <i>ultimum</i>	20/01/2014 – <i>Ochrobactrum</i> sp.	21/01/2014 – <i>P. ultimum</i>
<i>P. putida</i> – <i>P. ultimum</i>	20/01/2014 – <i>P. putida</i>	21/01/2014 – <i>P. ultimum</i>
<i>P. ultimum</i> – <i>Ochrobactrum</i> sp.	20/01/2014 - <i>P. ultimum</i>	21/01/2014 – <i>Ochrobactrum</i> sp.
<i>P. ultimum</i> – <i>P. putida</i>	20/01/2014 - <i>P. ultimum</i>	21/01/2014 – <i>P. putida</i>

Las siembras del hongo se realizaron colocando un pequeño fragmento de micelio del subcultivo realizado el 17 de enero de aproximadamente de 5 x 5 mm de tamaño en el centro de otra placa con PDA. Al día siguiente, o bien no se hizo ninguna siembra adicional (tratamiento testigo), o se inoculó bacterias provenientes de cultivo realizado el día 17. En un caso se inoculó una pequeña cantidad de bacteria *Ochrobactrum* sp. tomada de la placa del día 17 con el asa de siembra en picadura (tratamiento *P. ultimum* – *Ochrobactrum* sp.) y en otro la bacteria inoculada sobre el hongo fue *P. putida* (tratamiento *P. ultimum* – *P. putida*). En los dos casos, el inóculo bacteriano se depositó en el centro del fragmento de *P. ultimum*, pinchando ligeramente el medio de cultivo situado justo por debajo para que las bacterias tocaran el medio y el hongo.

En los tratamientos donde se sembró primeramente la bacteria, ésta se inoculó puntualmente en el centro de la placa y al día siguiente se colocó un fragmento del cultivo de *P. ultimum* del día 17, justo encima del inóculo bacteriano con el fin de poner al hongo en contacto directo con las bacterias. Estos tratamientos se marcaron como: *Ochrobactrum* sp – *P. ultimum* y *P. putida* – *P. ultimum*, dependiendo de la especie

bacteriana sembrada. Se hicieron 4 placas por tratamiento y la temperatura de incubación, entre siembras y una vez que se realizaron todas ellas fue de 26°C.

El objetivo perseguido con la realización de este diseño se basó en detectar y valorar la interacción entre las bacterias aisladas y *P. ultimum* cuando crecieron juntos en medio de cultivo sintético, tal y como lo estaban haciendo cuando fueron aislados del tejido de la médula del brócoli afectado. En este sentido hay tres opciones posibles:

- 1.- Interacción de las dos especies bacterianas juntas o por separado con el desarrollo del hongo cuando crecen al mismo tiempo.
- 2.- Interacción de las dos especies bacterianas con el hongo cuando éstas están creciendo previamente a la siembra del hongo.
- 3.- Interacción de las dos especies bacterianas con el hongo cuando las bacterias fueron sembradas una vez que el hongo se encontraba en la fase lineal del crecimiento.

Las variables que se midieron en este experimento fueron: área del crecimiento de la colonia (cm²), tasa de crecimiento (cm²/día) y duración de la fase lineal (días), variables que se han definido en el apartado anterior (3.3).

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó del mismo modo que en el apartado anterior (3.3).

Al cuarto día de crecimiento, se examinaron las hifas del hongo en todos los tratamientos definidos en los dos tipos de experimentos con el fin de detectar posibles cambios o anomalías visuales en las estructuras microscópicas del hongo cuando creció en contacto con las bacterias. Para ello se examinó con un microscopio OLYMPUS BX50, modelo BX50F4, las hifas aéreas y sumergidas en el medio de cultivo en todos los tratamientos, anotando las observaciones destacadas y el grosor de las hifas.

3.5. Inoculación de microorganismos a muestras de tejidos vegetales sanos

El día 28 de enero se cosecharon, de un cultivo regional, 30 piezas de brócoli de variedad no especificada por razones comerciales procedente de un cultivo del Campo de Cartagena. Las pellas se almacenaron en una cámara frigorífica durante 3 días a 5°C hasta poner en marcha el experimento que se va a describir en esta sección.

Por otro lado, se procedió a repicar los dos aislados bacterianos para este experimento el día 30 de enero de 2014 y para el hongo se utilizó el repicado del día 16 de diciembre de 2013.

El test de inoculación a fragmentos de tejido de tallo floral comenzó el día 31 de enero, a partir de los aislados bacterianos crecidos el día anterior y de las pellas de brócoli almacenadas. El procedimiento realizado se describe a continuación:

- 1.- Separación del tallo floral del resto de la inflorescencia con un cuchillo afilado. La parte de la inflorescencia se desechó.
- 2.- Lavado de todos los tallos con agua de abastecimiento con el fin de eliminar suciedad y parte de la comunidad de microorganismos presentes en la superficie del tejido.
- 3.- Desinfección de la zona superficial de la corteza afectada con una mezcla comercial de lejía y detergente diluida al 20% (v/v) en agua destilada. Dejando actuar la mezcla durante unos 5 min.
- 4.- Desinfección con etanol reactivo 96% (v/v) aplicado por pulverización.
- 7.- Lavado con agua destilada esterilizada en la zona afectada para eliminar los residuos de desinfectantes.
- 8.- Corte aséptico transversal eliminando una fina sección de la parte basal y apical del tallo para dejar una longitud de tejido más o menos homogénea de unos 10 cm. Los cortes se realizaron con un cuchillo afilado y flameado.

Las muestras desinfectadas de tallos se dividieron en grupos de 5 piezas y se colocaron en bandejas separadas para proceder a su inoculación en una cabina de flujo. Se hicieron 6 tratamientos variando el microorganismo inoculado: a) *P. ultimum*, b) *Ochrobactrum* sp., c) *P. putida*, d) *P. ultimum* + *Ochrobactrum* sp., e) *P. ultimum* + *P. putida*, f) *P. ultimum* + *Ochrobactrum* sp. + *P. putida*.

El procedimiento desarrollado para la realización de las inoculaciones varió dependiendo si el microorganismo inoculado fue *P. ultimum* o las bacterias. El hongo se inoculó cortando, con un bisturí flameado y previamente mojado en alcohol, una porción de agar de la zona limítrofe de la colonia. Entonces, se hizo un cuadradito con la ayuda del bisturí en la zona central de la médula del tallo floral, una vez saneado el fragmento de manera aséptica, mediante el corte de la zona con un cuchillo flameado, el micelio del hongo quedó en contacto directo con el tallo y la zona del agar sin micelio quedaba al descubierto, zona por la que se hizo pasar un cinta adhesiva para sujetarlo bien y evitar, de este modo, la pérdida del fragmento de agar.

El inóculo infectivo de bacterias se preparó realizando una suspensión en agua destilada estéril de cada especie a partir de la placa de cultivo donde se desarrollaron. El ajuste de la dosis infectiva se hizo mediante recuento de células en una cámara de recuento de tipo Thoma bajo el aumento proporcionado por un microscopio de contraste de fases OLYMPUS BX41, modelo BX41TF. Los valores de concentración de inóculos infectivos fueron los siguientes: $3,835 \cdot 10^7$ bacterias/mL para *Pseudomonas putida* y $4,592 \cdot 10^7$ bacterias/mL para *Ochrobactrum* sp.

Las bacterias se inocularon con un punzamiento previo, en la zona central del tejido de la médula del tallo, con la ayuda de un punzón estéril, realizando un agujero de aproximadamente un centímetro y medio de profundidad. Entonces, con la ayuda de una pipeta, se introdujo la mezcla de bacterias y agua estéril, (aproximadamente 50 μ L de suspensión bacteriana). Para la siembra conjunta de las bacterias *Pseudomonas putida* y *Ochrobactrum* sp., se mezclaron 1 mL de cada suspensión y se inoculó el mismo volumen (50 μ L).

Las bandejas conteniendo todas las piezas inoculadas (una bandeja por cada tratamiento) se almacenaron a temperatura ambiente a aproximadamente 18°C y 94% de

humedad relativa. Para alcanzar una elevada humedad relativa dentro de las bandejas, éstas se convirtieron en cámaras húmedas introduciendo un vaso lleno de agua en el interior de la bandeja y cubriendo parcialmente cada bandeja con una bolsa de plástico para permitir un intercambio gaseoso normal, elevando la atmósfera interna en vapor de agua. Los resultados se evaluaron de acuerdo con una escala visual de incidencia y severidad (Fig. 7).

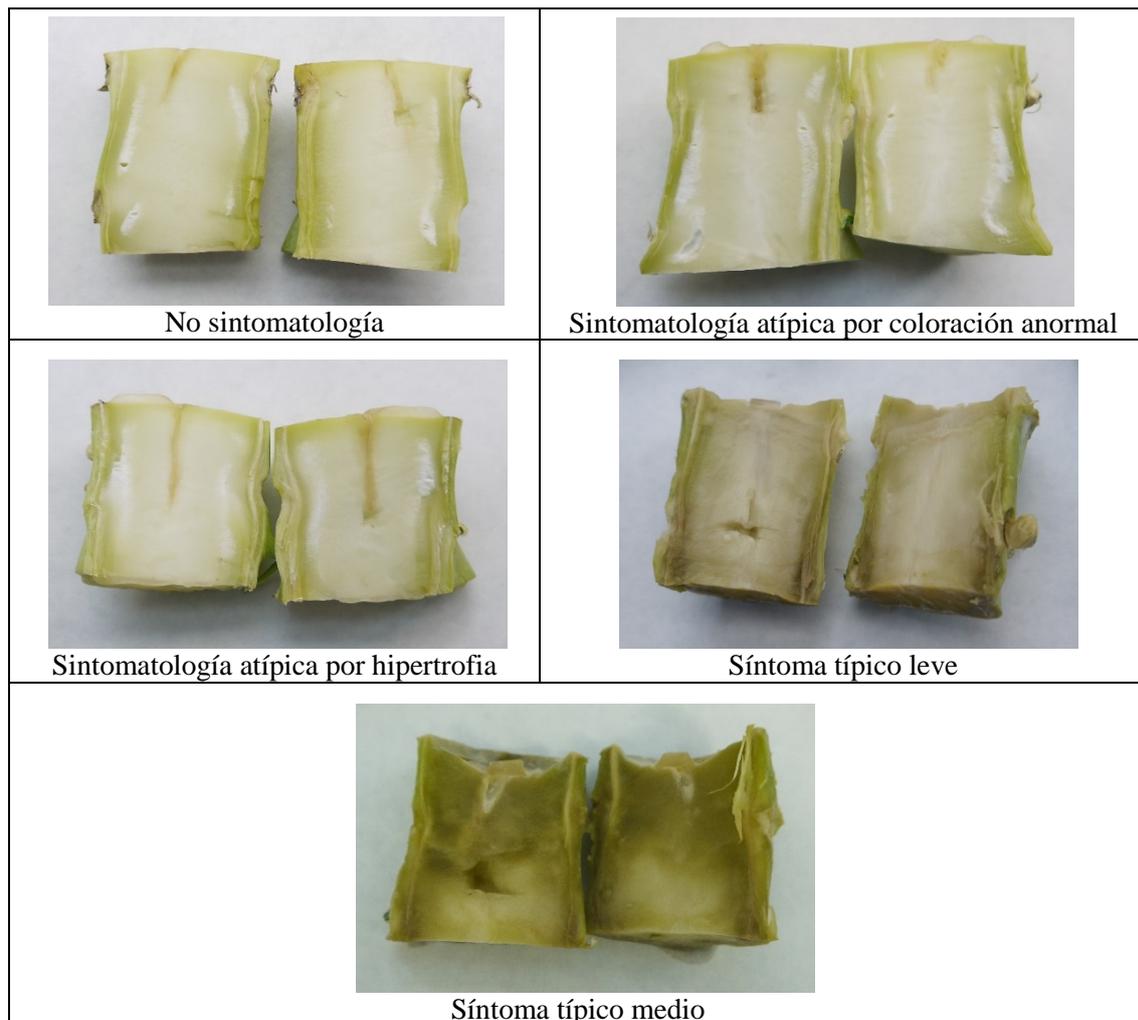


Fig 7. Grados de severidad de los distintos síntomas típicos y atípicos de la enfermedad observados en los fragmentos del tallo del brócoli.

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento de microorganismos de piezas enfermas

De la visualización directa del tejido de los tallos florales afectados por los síntomas definidos en el capítulo 2.2.3., se pudo observar la presencia de hifas fúngicas hialinas y no tabicadas o con escasos tabiques (Fig. 8). En un primer momento se sospechó de la presencia de *Sclerotinia* sp., aunque las hifas presentaban pocos tabiques, pero las siembras realizadas en PDA, revelaron un micelio aéreo laxo y blanquecino que nunca llegó a formar esclerocios, por lo que se descartó que el hongo visualizado y cultivado, tanto en el tejido macerado como en el adyacente perteneciera a este género.

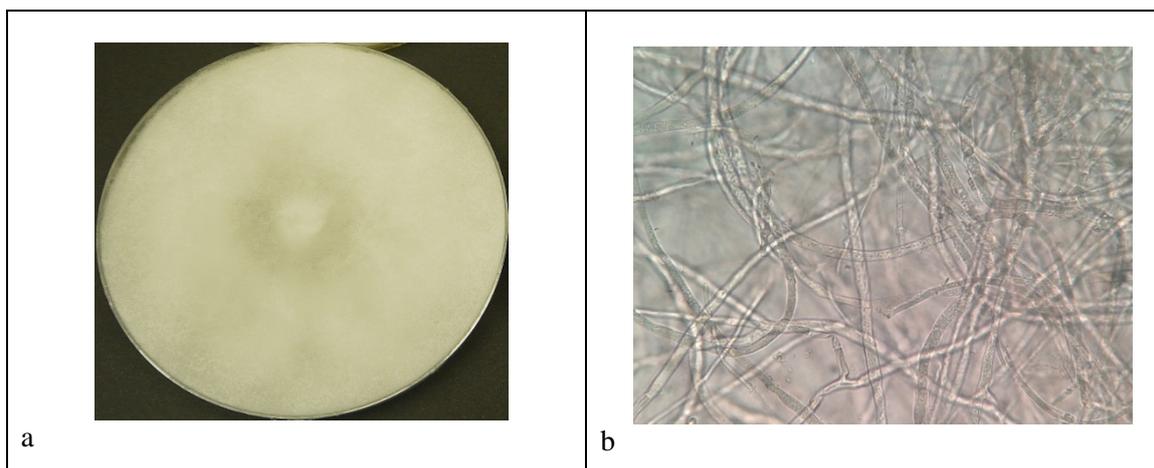


Fig. 8. a) Aspecto del micelio de *Pythium ultimum* aislado en PDA del interior de los tallos de brócoli afectados de podredumbre blanda. b) Aspecto de las hifas del hongo observado entre el tejido afectado a 400x.

Posteriormente, tras los cultivos realizados a partir de las zonas de tejido afectadas por los síntomas definidos en el capítulo 2.2.3., y de áreas limítrofes de tejido normal, se pudo aislar una especie de hongo y varias especies bacterianas.

De las siembras obtenidas directamente de los tejidos de la médula afectados de podredumbre por el procedimiento descrito anteriormente, se seleccionaron las distintas morfologías de colonias obtenidas y se clasificaron y nombraron por medio de acrónimos o claves (desde A hasta G, siete aislados morfológicos). Los resultados de las pruebas fenotípicas realizadas a los distintos aislados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de las pruebas fenotípicas realizadas a los distintos aislados de bacterias obtenidos del interior de la médula descompuesta de tallos florales de brócoli.

Aislado	Actividad pectinolítica	Metabolismo de la glucosa (O/F)*	Pioverdinas
A	+	+/+	-
B	-	+/+	-
C	+	+/-	+
D	-	+/+	-
E	-	+/+	-
F	-	+/-	+
G	-	+/-	-

* O/F: O metabolismo oxidativo de la glucosa; F: metabolismo fermentativo de la glucosa

De acuerdo con la Tabla 3, los aislados A y C cumplieron la condición básica para poder ser clasificados como bacterias pectinolíticas, es decir, el mínimo requerimiento para que puedan producir una podredumbre blanda bacteriana, pero solamente se aislaron del tejido ya macerado junto con las hifas de *P. ultimum*. Sin embargo, los aislados F y G se obtuvieron del tejido interno de la médula adyacente al tejido macerado. Las colonias del aislado G eran, en los dos medios de cultivo, de color blanco y convexas, mientras que las colonias del aislado F eran planas o menos convexas y de color pardo.

El aislado A presentó, además de actividad pectinolítica, un metabolismo anaerobio facultativo de la glucosa y no presentó pigmentos pioverdinas, por lo que puede ser un candidato a ser clasificado como *Erwinia carotovora* a falta de realizar su análisis genético que confirme su encuadre taxonómico. Mientras, el aislado C, presentó un metabolismo aerobio de la glucosa y pigmentos pioverdinas, es decir, podría clasificarse primeramente como una *Pseudomonas* pectinolítica del grupo fluorescente.

El resto de aislados obtenidos del tejido macerado: B, D y E, debían ser bacterias saprófitas que suelen acompañar a la maceración de los tejidos provocados por la actividad pectinolítica de microorganismos causantes de podredumbres blandas.

4.2. Identificación de aislados potencialmente patógenos

Las pruebas fenotípicas revelaron la presencia de especies de bacterias pectinolíticas en el interior del tejido, una de ellas con metabolismo anaerobio

facultativo y Gram negativa, candidato a pertenecer a la especie *Erwinia carotovora*, mientras que la otra presentaba metabolismo aerobio de la glucosa, Gram negativa y producía pigmentos pioverdinas, por lo que podría tratarse de una *Pseudomonas* pectinolítica del grupo fluorescente, tal como *P. viridiflava* o *P. marginalis* (*P. fluorescens*).

Por otro lado, los aislados F y G solamente fueron obtenidos del tejido limítrofe a la enfermedad acompañando a *P. ultimum*. Estas bacterias resultaron no tener actividad pectinolítica, aerobias y uno de ellos, el F, presentó pioverdinas, por lo que pertenecía al género *Pseudomonas* (Tabla 3).

Las pruebas de la PCR descritas en la sección 3.2.3., revelaron la presencia de *Pseudomonas putida* (aislado F) y de una bacteria con alta afinidad al género *Ochrobactrum* de la familia *Brucellaceae* (aislado G). Estas bacterias sólo fueron aisladas de las zonas del tejido medular próximas a las áreas maceradas junto con el hongo, por lo que creemos, que aun no siendo fitopatógenas se encontraban asociadas al hongo que posiblemente sea el causante de la enfermedad. En el tejido macerado se aisló al hongo y a las bacterias pectinolíticas definidas anteriormente (aislados A y C). También se localizaron otras especies bacterianas (aislados B, D y E), del tejido macerado que no presentaron actividad pectinolítica alguna, por lo que los consideramos puramente saprófitos u oportunistas, presentes o colonizando el tejido ya descompuesto.

El hongo aislado (Fig. 8a) fue repicado en sucesivas ocasiones sobre PDA y se procedió a realizar su análisis genético porque no manifestaba estructuras de reproducción que facilitara su encuadre taxonómico. Solamente se llegó a determinar que sus hifas eran hialinas y cenocíticas (Fig. 8b).

En relación al análisis genético del hongo aislado, el análisis de las secuencias de nucleótidos obtenidas resultaron homólogas a la secuencia del hongo *Pythium ultimum* depositada en la base de datos de GenBank NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). El análisis de las secuencias de los aislados dio un 95% de similitud con *Pythium ultimum* (GenBank AB108063).

Respecto al análisis genético de las bacterias merece destacar que el ARNr 16S (16S rRNA en inglés) es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos que, junto con 21 proteínas, forman la subunidad pequeña (30S) del ribosoma de los procariontes. Los genes que lo codifican son llamados 16S rDNA, o *rrs*, y son ampliamente usados en estudios genéticos porque mediante la comparación de secuencias ARNr 16S (o de los genes que los codifican) se puede identificar especies y/o establecer relaciones filogenéticas entre organismos.

El análisis de las secuencias de los aislados de F dio un 99% de similitud con *Pseudomonas putida* (GenBank FJ161217.1) y el de las secuencias de los aislados de G una similitud de 96 % con *Brucellaceae bacterium* (GenBank HM113640.1). Las pruebas fenotípicas realizadas ayudaron a la identificación final a nivel de género como *Ochrobactrum*. La familia *Brucellaceae* se compone de tres géneros; *Ochrobactrum*, *Mycoplana* y *Brucella*. *Mycoplana* forma filamentos ramificados antes de la división celular y no es capaz de crecer a un pH menos de 5, pero lo puede hacer pobremente a 5,5, es decir, el pH del medio PDA. Sin embargo, hemos comprobado que crece abundantemente en PDA y nunca ha formado filamentos. Respecto a *Brucella*, está compuesto por especies que forman células en forma de coco o cocobacilo y de motilidad negativa, por lo que no se corresponde con nuestro aislado.

4.3. Interacciones *in vitro* entre los microorganismos implicados

El ensayo de confrontación dual entre las bacterias y hongo que estaban creciendo en la zona limítrofe al tejido macerado puso de manifiesto una interacción positiva principalmente entre el aislado de *Ochrobactrum* sp. y *P. ultimum*, tanto creciendo en medio PDA (Fig. 9), como en PCA (Fig. 10). El efecto visual más drástico de esta interacción se manifestó porque el hongo redujo su tasa de crecimiento conforme se aproximaba a la línea de siembra de la bacteria, llegando a detener totalmente su desarrollo antes de alcanzar la línea bacteriana (Fig. 11).

Las curvas de crecimiento micelial del aislado de *P. ultimum* revelaron una cinética típica de un hongo cuando crece en medio de cultivo sólido (Figs. 9a y 10a). Este tipo de curvas han sido ampliamente caracterizadas para diversos aislados de *Botrytis cinerea* (Martínez *et al.*, 2003a, 2008; 2009 y 2011). *Ochrobactrum* sp. redujo

el crecimiento del micelio de *P. ultimum* durante la fase lineal del desarrollo de éste. Esto sugiere que esta especie bacteriana es capaz de sintetizar toxinas difusibles contra el hongo en medio de cultivo sintético (Figs. 9b y 10b). Estas toxinas llegaron a dañar las hifas, especialmente las sumergidas del hongo, por lo que posiblemente éste debió de ser el impedimento para el desarrollo normal de *P. ultimum* a su tasa de crecimiento normal. En estas condiciones, las hifas del hongo fueron más gruesas y con ramificaciones cortas. A veces se observaban algunas malformaciones en forma de abultamientos (Fig. 12).

P. ultimum presentó un crecimiento muy rápido a 26°C. La fase de la latencia fue de escasas horas (datos no presentados), ya que se comprobó bajo la lupa binocular, que las hifas empezaron a crecer pocas horas después de realizar la siembra en los dos medios de cultivo. Por este rápido crecimiento (tasa de crecimiento del orden de 20 cm²/día en PDA y aproximadamente 16 cm²/día en PCA al primer día de desarrollo (Figs. 13 y 14), la fase exponencial, que generalmente dura menos de 20 horas en la mayoría de las especies fúngicas, pasó desapercibida. La fase lineal no duró más de dos días (Figs. 9 y 10). En este momento el hongo detuvo su crecimiento puesto que ya alcanzó el borde de la placa Petri de cultivo.

La presencia de la bacteria *Ochrobactrum* sp. en confrontación dual ralentizó el crecimiento de *P. ultimum* hasta detenerlo finalmente antes de alcanzar la línea de siembra de la bacteria. Este efecto fue ligeramente mayor en PCA que en PDA (Figs. 9, 10 y 11b). Sin embargo, la presencia de *P. putida* retardó el crecimiento del hongo sin detenerlo por completo (Figs. 9, 10 y 11c). La población mixta de las dos especies bacterianas tuvo un efecto similar al obtenido por cada una de las bacterias por separado, pero éste fue más acentuado en PCA. La única bacteria que fue capaz de detener el crecimiento de *P. ultimum* fue *Ochrobactrum* sp., pero este efecto se vio ligeramente eliminado cuando *Ochrobactrum* sp. se combinó con *Pseudomonas putida*.

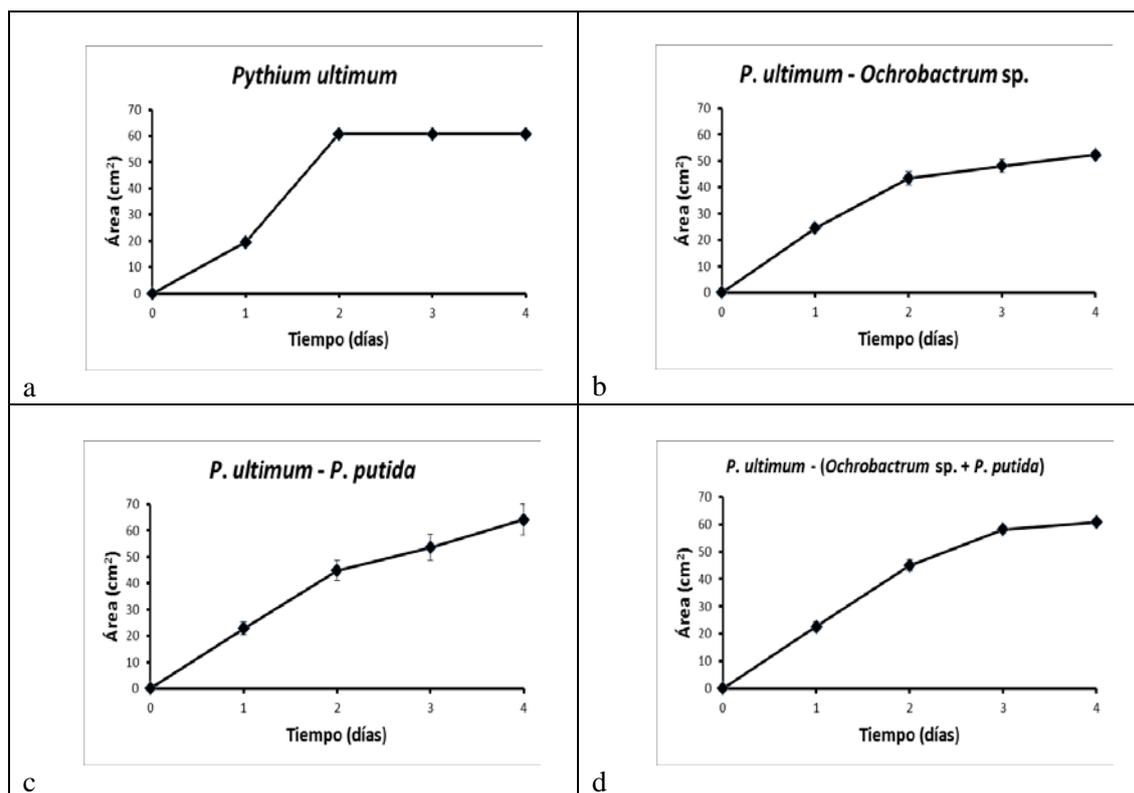


Fig. 9. Crecimiento del micelio de *P. ultimum* obtenido de la podredumbre blanda del tallo del brócoli creciendo en PDA a 26°C en a) ausencia o b), c), d) presencia de bacterias asociadas. Las barras verticales son la desviación estándar (n = 4)

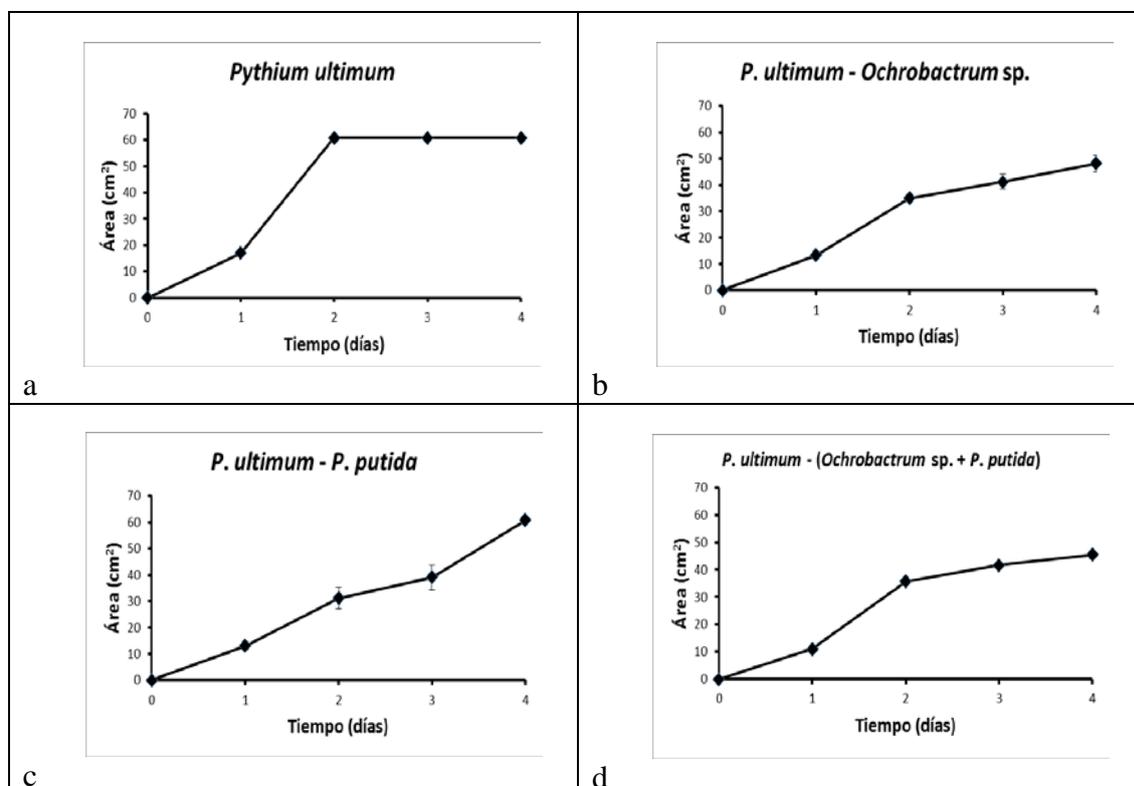


Fig. 10. Crecimiento del micelio de *P. ultimum* obtenido de la podredumbre blanda del tallo del brócoli creciendo en PCA a 26°C en a) ausencia o b), c), d) presencia de bacterias asociadas. Las barras verticales son la desviación estándar (n = 4)

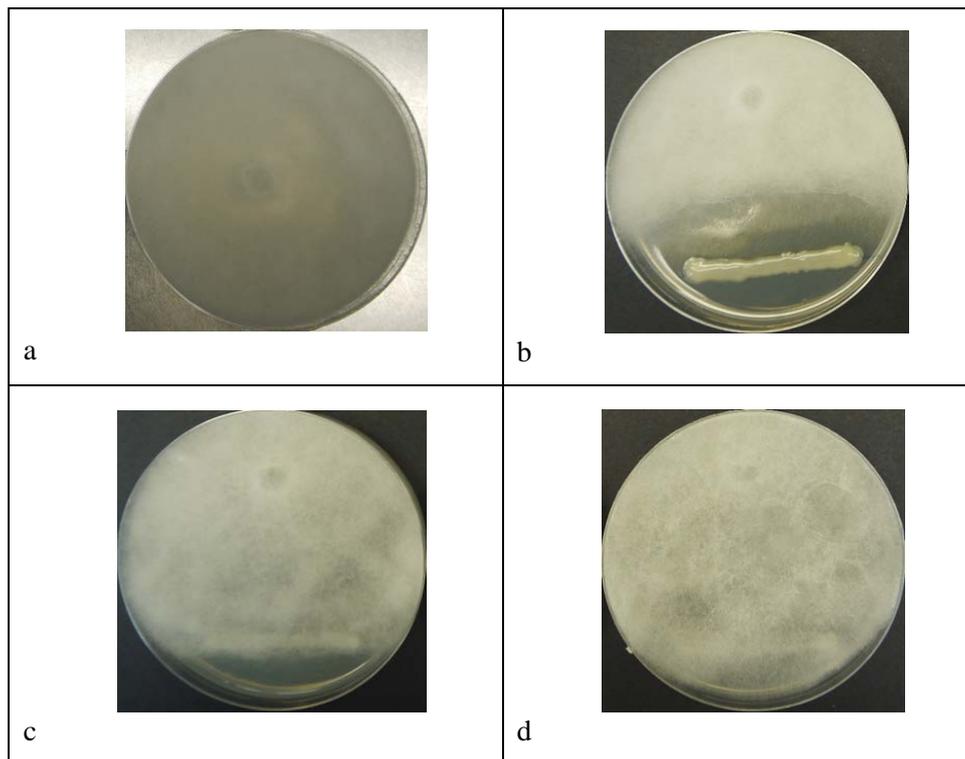


Fig. 11. Cultivos duales de *P. ultimum* con *Ochrobactrum* sp. o *Pseudomonas putida* aislados del tejido limítrofe de la podredumbre blanda del tallo del brócoli, creciendo en PDA tras 4 días a 26°C. a) *P. ultimum*, b) *P. ultimum* vs. *Ochrobactrum* sp., c) *P. ultimum* vs. *Pseudomonas putida*, d) *P. ultimum* vs. *Ochrobactrum* sp. + *P. putida*.

La línea bacteriana fue sembrada 4 días antes

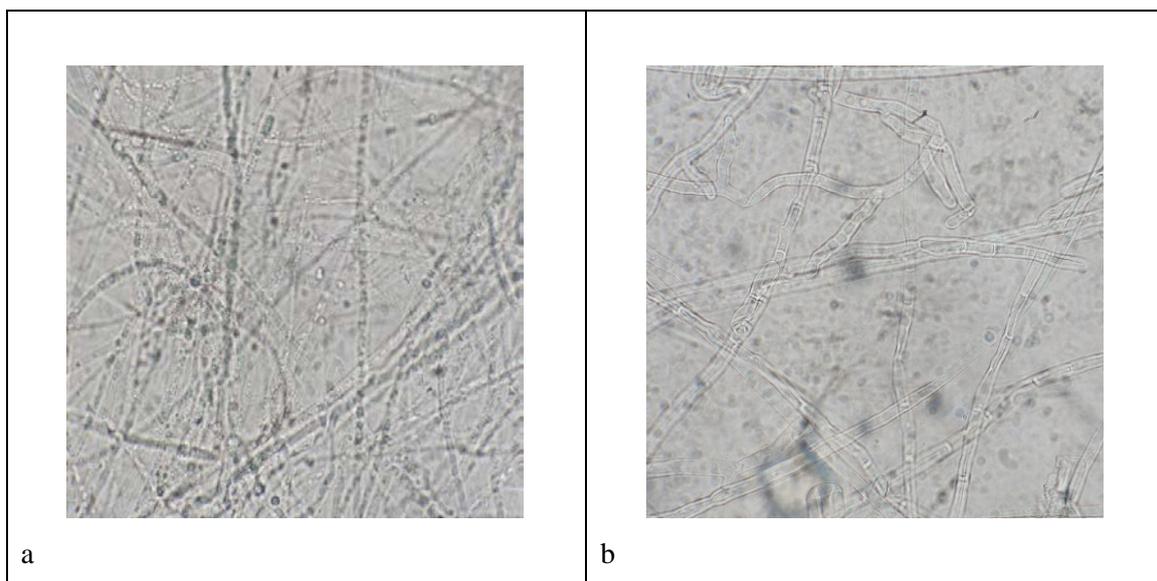


Fig. 12. Daños causados en las hifas sumergidas de *P. ultimum* provocadas por la presencia en medio de cultivo sintético de PDA de la bacteria *Ochrobactrum* sp. a) *P. ultimum*, b) *P. ultimum* en presencia de *Ochrobactrum* sp.

El micelio normal de *Pythium ultimum* creciendo en PDA y en PCA presentó hifas finas y gruesas, con un grosor comprendido entre 3,7 y 7,5 μm . Sin embargo, el micelio sumergido en el medio de cultivo no presentó hifas gruesas o éstas fueron muy escasas. El espesor fue generalmente menor de 5 μm . El aspecto del micelio aéreo del hongo en presencia de *Ochrobactrum* sp., no mostró modificaciones significativas pero, el micelio sumergido mostró ciertas diferencias a cuando *P. ultimum* creció sin la presencia de la bacteria (Fig. 12). Este micelio presentó la presencia de algunos tabiques en PDA solamente, ramificaciones cortas, poco desarrolladas, un mayor grosor de las hifas, llegando incluso a 10 μm y hubo presencia de hifas ligeramente tortuosas, siendo estas deformaciones muy similares, aunque menos pronunciadas, a las obtenidas en diversos aislados de *Botrytis cinerea* de plantas ornamentales por Martínez *et al.* (2007). La población mixta de las dos especies bacterianas modificó la estructura de las hifas aéreas, llegando a alcanzar espesores cercanos a las 15 μm y con ramificaciones cortas. Sin embargo no hubo efecto sobre las hifas sumergidas.

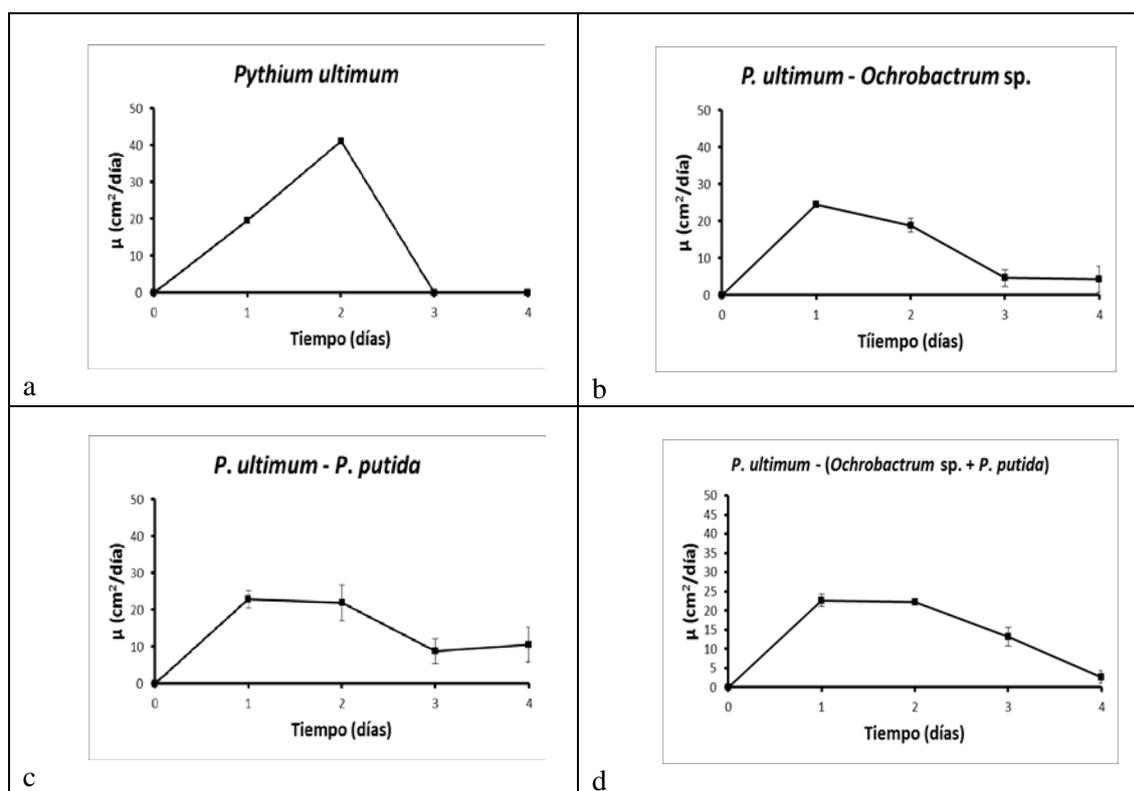


Fig 13. Tasas de crecimiento del micelio de *P. ultimum* obtenido de la podredumbre blanda del tallo del brócoli creciendo en PDA a 26°C en a) ausencia o b), c), d) presencia de bacterias asociadas.

Las barras verticales son la desviación estándar (n = 4)

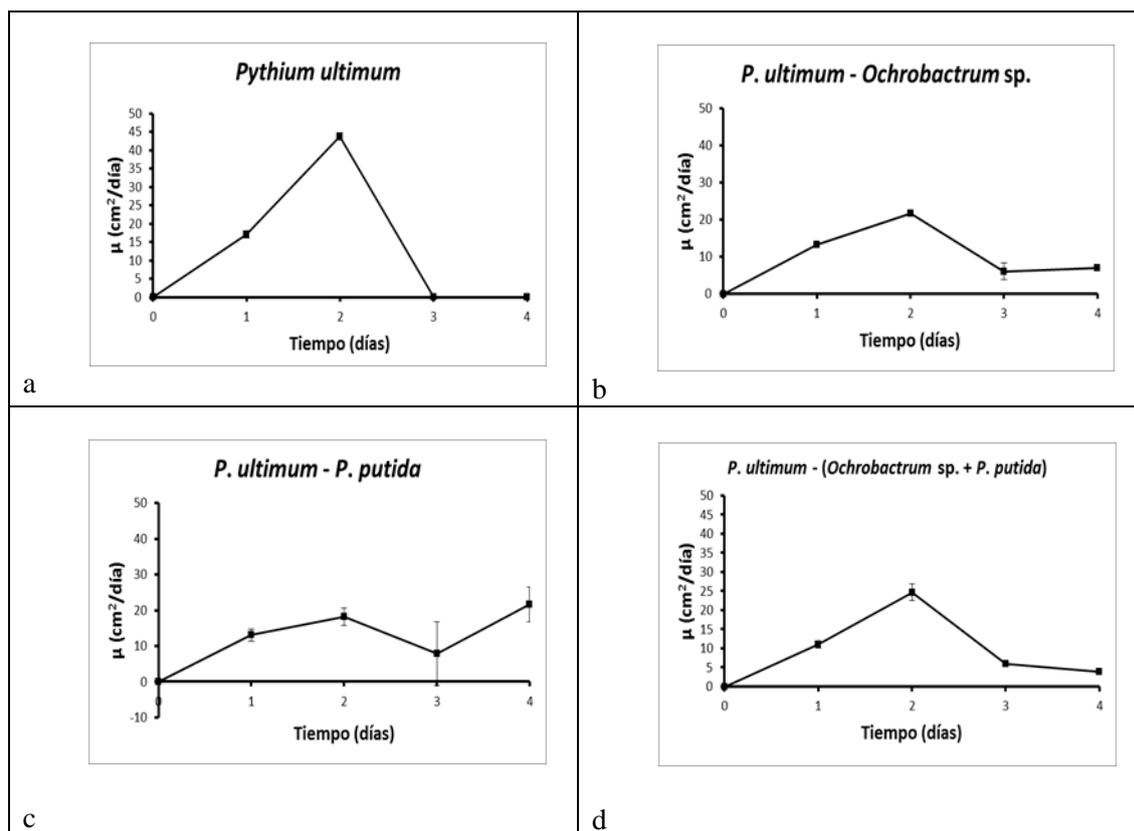


Fig 14. Tasas de crecimiento del micelio de *P. ultimum* obtenido de la podredumbre blanda del tallo del brócoli creciendo en PCA a 26°C en a) ausencia o b), c), d) presencia de bacterias asociadas.

Las barras verticales son la desviación estándar (n = 4)

4.4. Crecimiento *in vitro* de los microorganismos implicados

El ensayo de crecimiento mixto de las bacterias junto a *P. ultimum* se realizó para comprobar el efecto que podría tener la interacción de las bacterias cuando estaban creciendo en presencia directa con las hifas del hongo. Suceso muy similar al encontrado en las piezas de brócoli afectadas por la enfermedad, pero en medio de cultivo sintético de PDA. Los resultados de este experimento se pueden observar en las Figs. 15 y 16, en relación al efecto de la interacción sobre el crecimiento del hongo (Fig. 15) y sobre su tasa de crecimiento (Fig. 16).

La presencia de *Ochrobactrum* sp., creciendo al mismo tiempo que *P. ultimum*, redujo considerablemente el crecimiento del hongo durante los dos primeros días, es decir, durante el desarrollo de la fase lineal del crecimiento del hongo (Figs. 15b y 16b).

Esto indica que la bacteria, que presenta ciertas propiedades antagonista contra *P. ultimum*, según se desprendió del experimento anterior, fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo sólo en los primeros días, posiblemente cuando la bacterias se encuentra en su fase exponencial de crecimiento y se encuentra más activa. La presencia de *Pseudomonas putida*, tuvo un efecto similar, pero éste fue menos acusado que el de *Ochrobactrum* sp. (Figs. 15c y 16c). Este efecto inhibidor o, más bien retardador, de la bacteria solamente ocurrió cuando este microorganismo se sembró antes que el hongo (Figs. 15b y c; 16b y c). Sin embargo, cuando el hongo se sembró antes que las bacterias, no hubo reducción del crecimiento alguno, debido posiblemente a la imposibilidad de colonización de la bacteria en presencia del hongo en fase lineal de crecimiento (Figs. 15d, e, f y g; 16d, e, f y g).

En relación al aspecto de las hifas de *P. ultimum*, se pudo comprobar la presencia de unos pocos tabiques en el micelio aéreo compuesto fundamentalmente de hifas finas de 2,5 μm de grosor y siempre inferiores a 7,5 μm . Las hifas sumergidas presentaron escasos tabiques, siendo ligeramente más gruesas que las del micelio aéreo.

En los casos en los que hubo ralentización del crecimiento del hongo porque la siembra de las bacterias se realizó antes que las del hongo, se observó que las hifas aéreas eran muy homogéneas, en torno a 5 μm de grosor, mientras que las del micelio sumergido eran ligeramente más tabicadas y ligeramente más finas que cuando creció sin la presencia de las bacteria *Ochrobactrum* sp. (5 μm de grosor). La presencia de *P. putida* antes de la siembra el hongo indujo cambios similares a los producidos por *Ochrobactrum* sp. (datos no presentados). Como excepción la presencia de esta bacteria ocasionó ciertas deformación de las hifas sumergidas de *Pythium ultimum*.

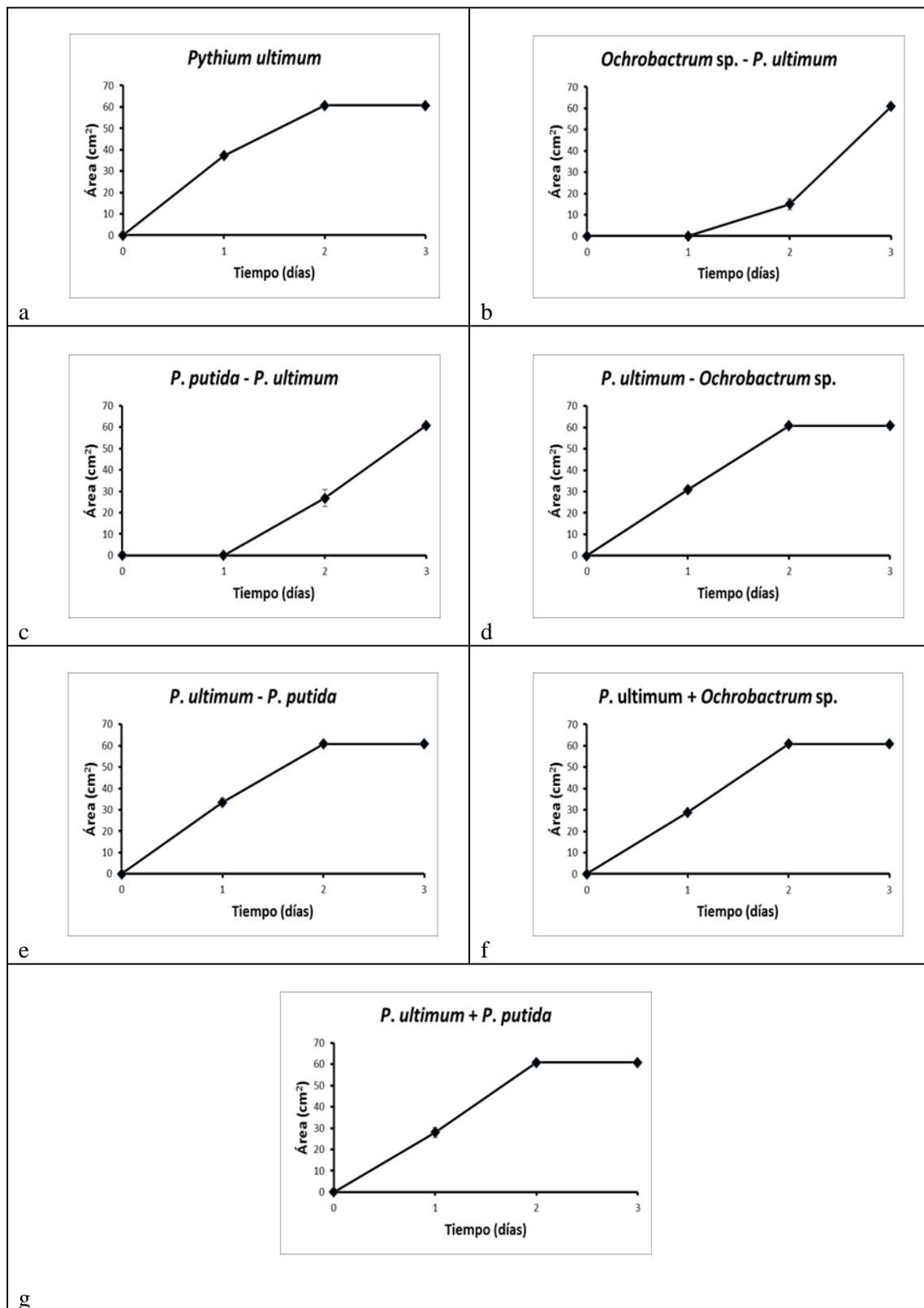


Fig 15. Crecimiento del micelio de *P. ultimum* obtenido de la podredumbre blanda del tallo del brócoli creciendo en PDA a 26°C en a) ausencia o b), c), d), e), f) y g) presencia de bacterias asociadas creciendo junto con las hifas del hongo al mismo tiempo. Las barras verticales son la desviación estándar (n = 4)

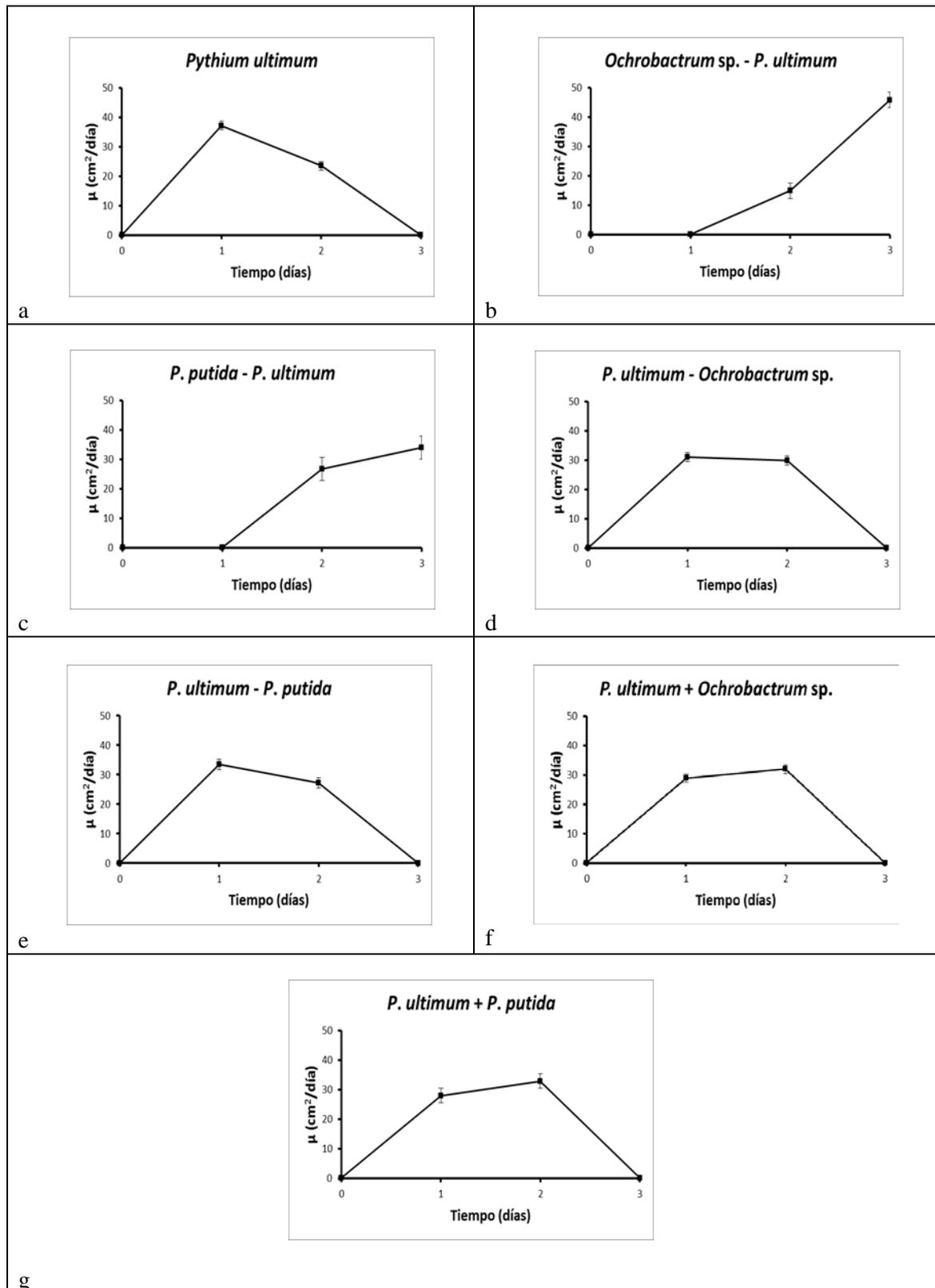


Fig. 16. Tasas de crecimiento del micelio de *P. ultimum* obtenido de la podredumbre blanda del tallo del brócoli creciendo en PDA a 26°C en a) ausencia o b), c), d), e), f) y g) presencia de bacterias asociadas creciendo junto con las hifas del hongo al mismo tiempo.

Las barras verticales son la desviación estándar (n = 4)

4.5. Pruebas de inoculación en fragmentos de plantas

La inoculación de microorganismos potencialmente patógenos a fragmento de tejidos sanos es una técnica utilizada comúnmente en fitopatología con el propósito de reproducir los síntomas de una enfermedad de acuerdo con los postulados de Koch. La inoculación sobre fragmentos de vegetales constituye una ayuda muy importante para la emisión de diagnósticos. Aunque no se trata de una verdadera prueba de patogénesis, se recurre a ella con mucha frecuencia al comportarse el fragmento vegetal como un medio de cultivo que favorece la multiplicación del patógeno. Es una técnica muy buena para el aislamiento indirecto del patógeno. Los saprófitos producen síntomas atípicos o no producen síntomas (Andrés-Yeves *et al.*, 1991).

La prueba de inoculación a fragmentos de tejido reprodujo síntomas de la enfermedad en todos los casos en los que se inoculó *P. ultimum*, pero la severidad dependió de la interacción de las bacterias inoculadas. Así, la inoculación solamente del hongo indujo síntomas típicos leves de la enfermedad (Tabla 4; Figs. 7 y 17a). Cuando el hongo se inoculó junto con *Ochrobactrum* sp., los síntomas fueron muy similares a los obtenidos con la inoculación exclusiva del hongo. Sin embargo, cuando se inoculó con *P. putida* o con *P. putida* junto con *Ochrobactrum* sp., los síntomas típicos se acentuaron, es decir, la interacción de la bacteria *P. putida* junto con *P. ultimum* potenció los síntomas de la enfermedad (Tabla 4; Figs. 7, 17 y 18). La inoculación exclusiva de *Pseudomonas putida* fue capaz de desarrollar hipertrofia en uno de los fragmentos (Fig. 17c).

Tabla 4. Síntomas desarrollados en los fragmentos del tallo del brócoli inoculados con *P. ultimum* y las bacterias *P. putida* y *Ochrobactrum* sp.

INOCULACIÓN	Nº FRAGMENTO	OBSERVACIONES
<i>Pythium ultimum</i>	1	Síntoma típico leve (2)
	2	Síntoma típico leve (2)
	3	Síntoma típico leve (3)
	4	Síntoma típico leve (1)
	5	Síntoma típico leve (2)
<i>Ochrobactrum</i> sp.	1	No sintomatología
	2	No sintomatología
	3	No sintomatología
	4	No sintomatología
	5	No sintomatología
<i>Pseudomonas putida</i>	1	Síntoma atípico: coloración anormal + hipertrofia
	2	Síntoma atípico: coloración anormal + hipertrofia
	3	Síntoma atípico: coloración anormal + hipertrofia
	4	Síntoma atípico: coloración anormal + hipertrofia
	5	Síntoma atípico: coloración anormal + hipertrofia
<i>P. ultimum</i> – <i>Ochrobactrum</i> sp.	1	Síntoma típico leve (3)
	2	Síntoma típico leve (2)
	3	Síntoma típico leve (2)
	4	Síntoma típico leve (2)
	5	Síntoma típico leve (2)
<i>P. ultimum</i> – <i>P. putida</i>	1	Síntoma típico medio (3)
	2	Síntoma típico medio (2)
	3	Síntoma típico medio (2)
	4	Síntoma típico medio (2)
	5	Síntoma típico medio (2)
<i>P. ultimum</i> - (<i>Ochrobactrum</i> sp. + <i>P. putida</i>)	1	Síntoma típico medio (3)
	2	Síntoma típico medio (3)
	3	Síntoma típico medio (2)
	4	Síntoma típico medio (2)
	5	Síntoma típico medio (2)

Nota: Grado de severidad dentro de cada categoría: (1) bajo (2) intermedio (3) alto

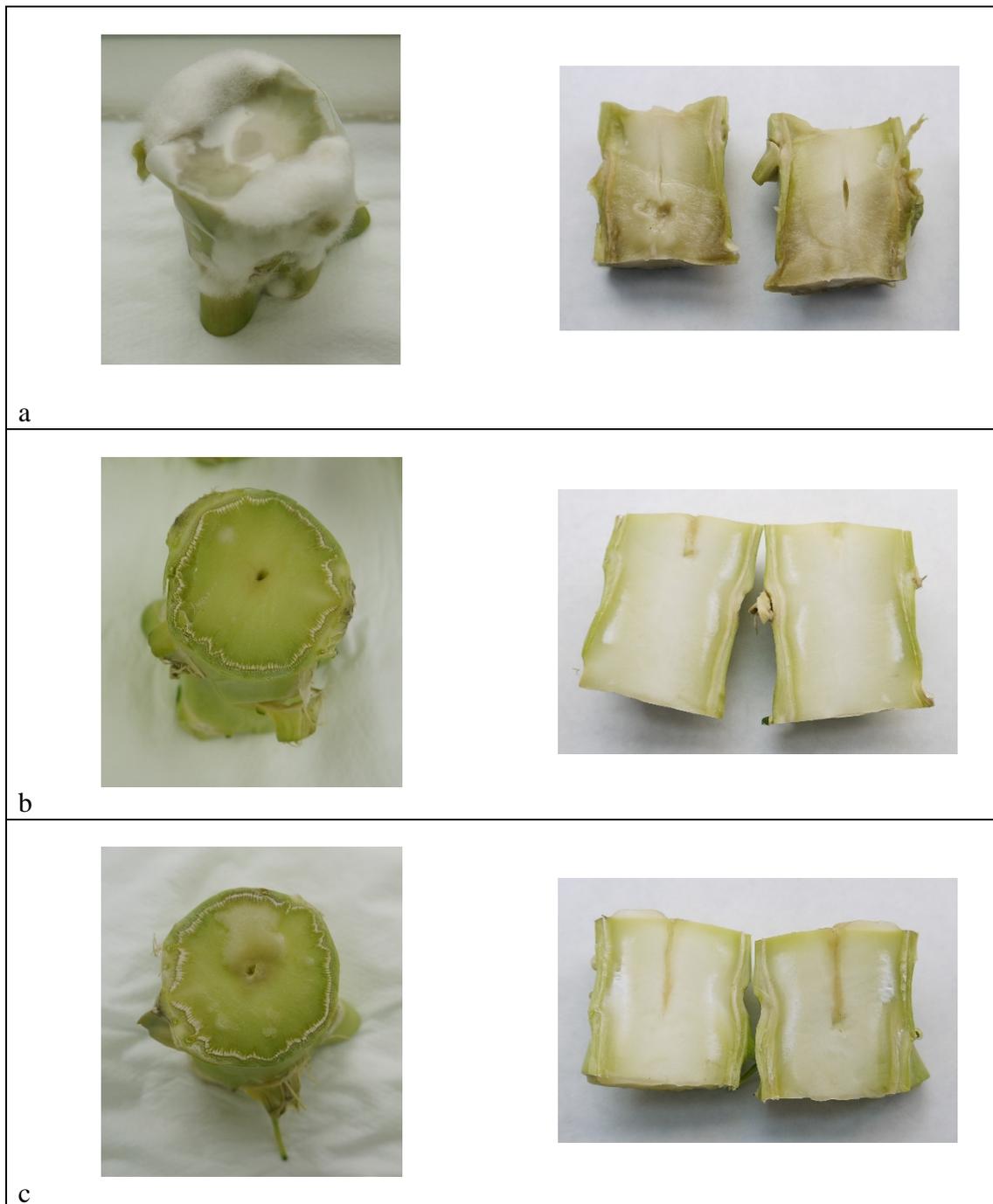


Fig. 17. Resultados de la inoculación de los microorganismos aislados objeto del estudio a fragmentos de tallos de brócoli maduro, tras 10 días a 19°C y 94% HR. (a) Fragmento inoculado con *P. ultimum*. (b) Inoculado con *Ochrobactrum* sp. (c) Inoculado con *P. putida*.

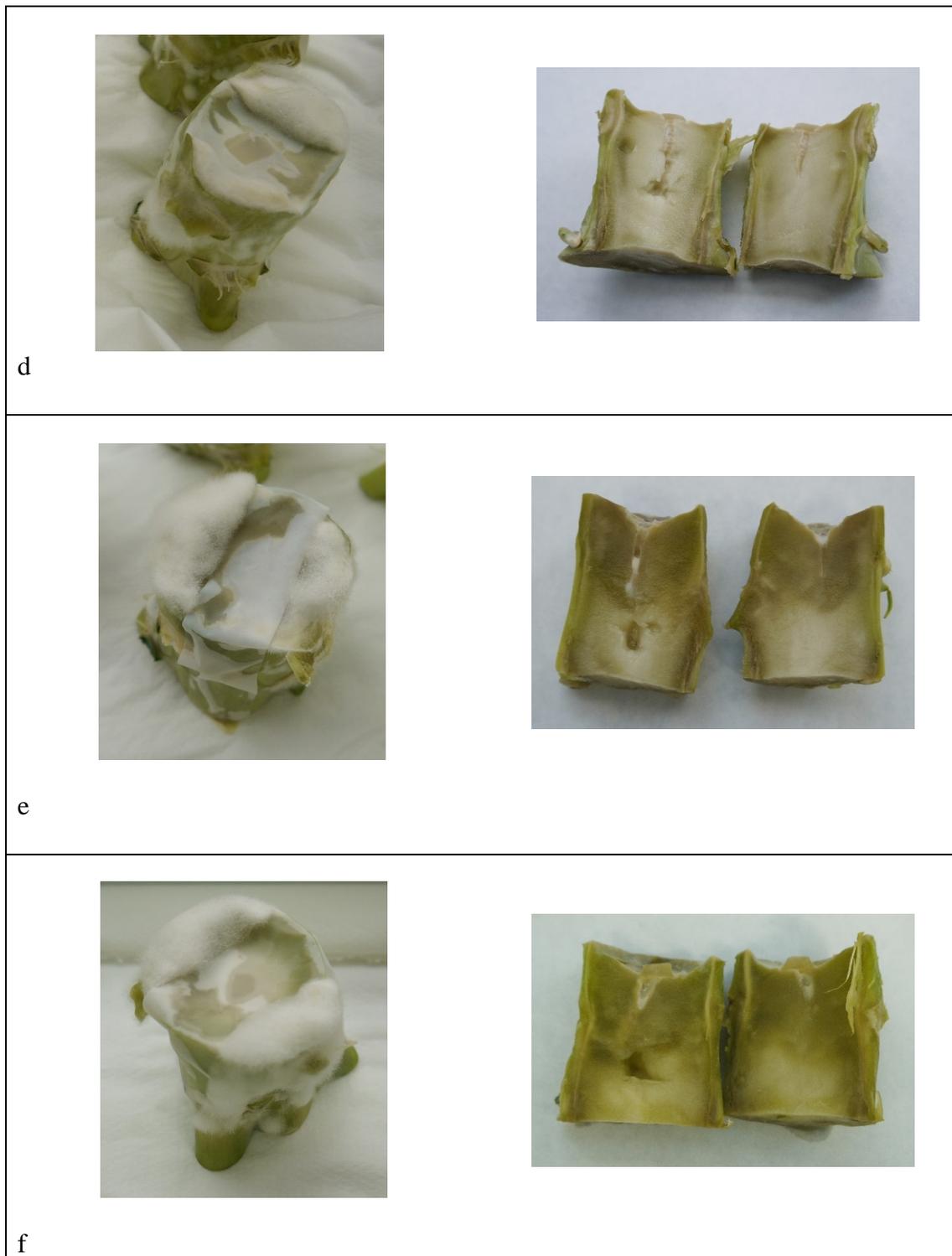


Fig. 18 (continuación) Resultados de la inoculación de los microorganismos aislados objeto del estudio a fragmentos de tallos de brócoli maduro, tras 10 días a 19°C y 94% HR. (d) Fragmento inoculado con *P. ultimum* + *Ochrobactrum* sp. (e) Inoculado con *P. ultimum* + *P. putida* (f) Inoculado con *P. ultimum* + *Ochrobactrum* sp. + *P. putida*.

Las muestras se visualizaron al microscopio para detectar signos de los microorganismos inoculados. En los casos en los que se inoculó las bacterias, éstas

podieron ser observadas en la mayoría de los casos sobre el tejido de la médula en contacto con el punto de inoculación (en el 80% de los fragmentos inoculados con *P. putida* y en el 60% de los inoculados con *Ochrobactrum* sp). Sin embargo, en los fragmentos inoculados con el hongo junto con *Ochrobactrum* sp. o con *Pseudomonas putida*, no se pudo detectar en ningún fragmento y bajo el microscopio la presencia de bacterias. La presencia de bacterias en el tejido inoculado junto con el hongo sólo pudo detectarse en uno de los fragmentos inoculados con los tres microorganismos.

El hongo que creció sobre los fragmentos de tejidos infectados volvió a ser identificado como *P. ultimum*.

5. DISCUSIÓN

5.1. Interacciones entre los microorganismos estudiados

La hipótesis que estamos barajando para intentar poner achacar los síntomas aparecidos y descritos sobre esta patología está basada en estudiar las implicaciones parasitarias que pueden tener los organismos aislados. Hemos encontrado la presencia de un hongo fitopatógeno, *Pythium ultimum* y de bacterias candidatas a ser bacterias fitopatógenas, organismos afines a *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas* pectinolíticas del grupo fluorescente (*P. marginalis* y *P. viridiflava*), todas ellas responsables de podredumbres blandas bacterianas. Sin embargo estas especies pectinolíticas solamente se aislaron del tejido macerado (Figs. 4a y 4b) y nunca del tejido adyacente a la podredumbre.

Como se ha comentado en secciones anteriores, las bacterias causantes de podredumbres bacterianas aprovechan tejidos senescentes para ser invadidos y generalmente requieren heridas para penetrar en ellos y colonizarlos. Por ello, son más habituales durante el almacenamiento de los productos recolectados o en tejidos de las plantas que presentan envejecimiento de tipo genético, programado o senescencia típica que se presenta durante la etapa normal de la ontogenia de la planta entera u órgano y es afectado por los factores ambientales (Barceló, 1998). Sin embargo, se conoce que, en brócoli, este tipo de bacterias son capaces de penetrar en el tejido intacto indirectamente; a través de debilitamientos de las capas celulares producidos por otras

especies bacterianas capaces de producir viscosina; sustancia que provoca pérdidas de solutos de las células ceras de la superficie del brócoli. A partir de este momento, cualquier bacteria presente en la superficie del tejido formando parte de la rizosfera o del filoplano es capaz de entrar al tejido interno de la planta.

Tanto *Erwinia carotovora*, como las especies *P. marginalis* y *P. viridiflava* han sido descritas como causantes de la podredumbre blanda bacteriana del brócoli (Hildebrand, 1989; Canaday, 1992). Parece que las dos subespecies definidas de *E. carotovora* son capaces de provocar la podredumbre blanda bacteriana. Sin embargo, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, parece más eficaz que *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. Además las especies pectinolíticas de *Pseudomonas* pueden provocar la podredumbre a temperaturas por encima de las de refrigeración, es decir, generalmente en el cultivo y sobre tejidos menos debilitados (Liao, 2006).

La existencia de aislados bacterianos saprófitos dentro del tejido macerado de la pella de los brócolis afectados de la enfermedad descrita en este trabajo, junto a la presencia de las bacterias pectinolíticas y el hongo *Pythium ultimum*, generó en un primer momento, cierta confusión, puesto que se encontraron varias especies de microorganismos patógenos en el interior de las pellas afectadas. Sin embargo, tras los cultivos realizados de la zona adyacente al tejido macerado que, como es bien sabido, constituye un tejido más adecuado a la hora de encontrar al microorganismo patógeno, debido a que todavía mantiene vivas parte de sus defensas y no es fácilmente colonizado por saprófitos, solamente se pudo aislar al hongo *P. ultimum*, que ya estaba presente en el tejido macerado, y a dos aislados bacterianos, *Pseudomonas putida* y una bacteria del género *Ochrobactrum*. Ninguna de las dos bacterias son fitopatógenas, por lo que creemos que la descomposición de la médula del tallo está ocasionada por el hongo y las bacterias podrían tener algún papel de tipo sinérgico o antagonista en la colonización del tejido por parte del patógeno. Posteriormente las bacterias pectinolíticas se encargarían de colonizar, junto con *P. ultimum* los tejidos macerados muertos y desprovistos de defensas.

P. putida es una bacteria perteneciente al grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes, pero ninguno de sus biovares se ha descrito que presente actividad fitopatógena (Holt *et al.*, 1994). Presenta un alto potencial de degradación de

compuestos aromáticos y orgánicos en general, y gran capacidad de colonizar el sistema radicular de las plantas, formando biopelículas. Los compuestos aromáticos son, después de los polisacáridos, las moléculas más abundantes en la biosfera (García *et al.*, 2003) y, al mismo tiempo, muy estables. Por ello esta especie bacteriana juega un papel importante en el suelo durante la degradación de restos vegetales y se asocia ampliamente a la rizosfera de las plantas donde, algunas cepas son capaces de presentar propiedades promotoras del crecimiento vegetal y otras presentan propiedades antagonistas contra algunos hongos fitopatógenos (Arevalo-Ferro *et al.*, 2005), tales como *Pythium* sp. (Amer y Utkhede, 2000) y *Fusarium* sp. (Validov *et al.*, 2007).

Dado que no se ha descrito ninguna cepa de *P. putida* como fitopatógena, es de suponer que la presencia de esta bacteria en el frente de ataque de la podredumbre fue casual o se encontraba asociada a *Pythium ultimum* en la colonización del tejido; único patógeno aislado de esta área de la enfermedad. Lo que parece que no hay duda, es que *P. putida* debió penetrar a partir del suelo por algún mecanismo específico a partir del tejido intacto o a partir de alguna abertura ocasionada por algún agente físico, como puede ser un daño mecánico.

En relación a *Ochrobactrum* sp., se trata de un grupo de especies pertenecientes a la familia *Brucellaceae* junto con los géneros *Brucella* y *Mycoplana* (Garrity y Holt, 2001). Son bacilos cortos Gram-negativos y aerobios estrictos. La especie tipo del género es *O. anthropi* (Holt *et al.*, 1994). Esta especie tiene cierto interés clínico, puesto se encuentra asociada muchas veces a infecciones ocasionadas por *Brucella* spp., aunque también es capaz de producir ciertas patologías variadas en humanos inmunodeprimidos. Esta especie también ha sido detectada en biopelículas, en suelos agrícolas y en aguas de riego. Las especies *O. grignonense* y *O. tritici* se aíslan frecuentemente del suelo y de las raíces del trigo, respectivamente (Holmes, 2005). Presentan bastantes afinidades con el género *Rhizobium*, habitante del suelo que coloniza la rizosfera y el rizoplano de ciertas plantas, estableciendo relaciones simbióticas con plantas leguminosas. Por ello, el microorganismo detectado, que no ha podido identificarse totalmente a nivel de especie por medio de la PCR, puede corresponder a una de las tres especies que se han citado y que son habituales en el suelo y rizosfera de las plantas. Quizás la ruta de entrada a la planta fue al unísono con *P. putida* en el proceso de infección y colonización del tejido por parte de *P. ultimum*.

Por otro lado, el hongo *P. ultimum* Trow produce esporangios esféricos, con 12–28 μm de diámetro, que normalmente son terminales, pero pueden ser intercalares; los esporangios germinan directamente. En cultivo se pueden desarrollar también formas esporangiales tipo barril, que miden 14-22,9 x 17-27,8 μm . Nunca se forman zoosporas. Los oogonios son lisos, normalmente terminales, raramente intercalares y esféricos, con 19,6-22,9 μm de diámetro. Las oosporas son esféricas, con 14,7-18,3 μm de diámetro y no llenan el oogonio. Los anteridios surgen de la pila oogonial directamente debajo del oogonio; normalmente se produce un anteridio por oogonio (Zitter *et al.*, 2004).

Van der Plaats-Niterink (1981) distinguió dos variedades dentro de esta especie: *P. ultimum* Trow var. *ultimum* y *P. ultimum* var. *sporangiiferum* Drechsler. Atendiendo a este autor, las descripciones de estas dos variedades son las siguientes: (a) *P. ultimum* var. *ultimum*. No suele formar esporangios. Hinchamientos hifales globosos, de 20-29 μm de diámetro, intercalares y, a veces, terminales. Oogonios terminales, a veces intercalares, globosos, de 14-25 μm de diámetro, de pared lisa. Anteridios en forma de saco, en número de 1-3 por oogonio. Oosporas apleróticas, globosas, de 12-21 μm de diámetro. (b) *P. ultimum* var. *sporangiiferum*. Los esporangios se producen fácilmente; son subglobosos, intercalares y terminales, de 23-32 μm de diámetro, con uno o a veces dos tubos de descarga. Las zoosporas se liberan fácilmente a 20°C. Oogonios globosos, de 15-26 μm de diámetro, lisos, generalmente terminales. Anteridios y oosporas como en la var. *ultimum*. De acuerdo con estas apreciaciones, se podría afirmar que el aislado obtenido de nuestro brócoli, que ha sido esporulado en medios de cultivo especiales como el V-8 elaborado a base de extractos vegetales, pertenece a *P. ultimum* var. *sporangiiferum*.

Los resultados obtenidos de los experimentos realizados *in vitro* con el fin de poner de manifiesto las posibles propiedades sinérgicas o antagonistas entre las bacterias y el hongo, confirmaron la existencia de interacción entre las especies bacterianas ensayadas y *P. ultimum*. En principio, cabría esperar una compatibilidad entre las tres especies, ya que éstas se aislaron de la misma zona del tejido que estaba en contacto con la parte macerada, pero los resultados sugieren ciertas propiedades antagónicas de *Ochrobactrum* sp. frente a *P. ultimum*. Cuando las dos especies se confrontaron, se pudo medir el efecto ralentizador que indujo la bacteria sobre el

crecimiento micelial del hongo. Este efecto, se puso de manifiesto bastante antes de que el hongo se pusiera en contacto físico con las bacterias, por lo que demuestra la capacidad del aislado de *Ochrobactrum* sp. para producir sustancias difusibles tóxicas en el medio de cultivo contra *P. ultimum*. La cepa *O. anthropi* TRS-2, ha sido aislada de la rizosfera de plantas de té y fue capaz, *in vitro*, de solubilizar fosfato, producir ácido indol-acético (AIA), sideróforos y exhibir propiedades antifúngicas en general contra los siguientes seis hongos patógenos: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sphaerostilbe repens*, *Phellinus noxius*, *Sclerotium rolfsii*, *Poria hypolaterita* y *Alternaria alterna* (Chakraborty *et al.*, 2009). Esta especie se puede clasificar pues dentro del grupo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, debido a su papel directo en el estímulo del crecimiento vegetal, es decir, en procesos tales como la solubilización de fosfatos, producción de AIA, además de sus efectos indirectos contra los patógenos por la producción de sideróforos o sustancias que se utilizan para la adquisición de hierro. La función de este grupo de sustancias, en algunos casos, está relacionada con la patogénesis o con la capacidad de antagonismo de algunas bacterias fitopatógenas, pero en otros casos no tiene ninguna relación (Montesinos y Beltrá, 2000). Las propiedades antifúngicas, en general, mostradas *in vitro* por los autores citados y en los resultados obtenidos en este trabajo, así como la capacidad de síntesis de sideróforos por parte de esta bacteria podría explicar, en cierta medida, el efecto antagonista de nuestro aislado mostrado contra *P. ultimum*, tanto en medio de cultivo PDA, como en PCA. Quizás, el tejido del brócoli, que contiene una alta cantidad de hierro, inhibe la producción de sideróforos por parte de la bacteria, siendo capaz de crecer ésta junto a *P. ultimum*. Mientras que en los medios de cultivo, más pobres en hierro porque están hechos a base de patata (PDA) y de extracto de levaduras (PCA), utilizados en los experimentos, se podría estimular la producción de sideróforos por parte de la bacteria, siendo uno de los factores principales para poder detener el crecimiento del hongo. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de otros mecanismos de inhibición contra *P. ultimum*, ya que la especie *P. putida* es capaz de producir sideróforos del grupo de las pioverdinas, y tuvo un efecto antagonista *in vitro* mucho más débil que el ofrecido por *Ochrobactrum* sp. Hay que tener en cuenta que el efecto antifúngico ofrecido por la cepa TRS-2 de *O. anthropi* fue debido a la presencia de varios tipos de mecanismos de acción (Chakraborty *et al.*, 2009).

En relación a la interacción de *Pseudomonas putida* con *Pythium ultimum*, se debe comentar que este aislado bacteriano fue capaz de reducir la tasa de crecimiento del hongo creciendo *in vitro*, pero no llegó a detenerlo por completo, tal y como ocurrió en el enfrentamiento con *Ochrobactrum* sp. También se debe considerar que cuando las bacterias crecen conjuntamente con el hongo *in vitro*, siendo éstas sembradas antes que el hongo, éstas retardan drásticamente el crecimiento del hongo durante los dos primeros días de cultivo, pero posteriormente recuperar su tasa normal. Sin embargo, cuando se siembra el hongo antes que las bacterias, el desarrollo del hongo no se ve afectado prácticamente. Esto sugiere una competencia por espacio o nutrientes en el que sale claramente beneficiado *P. ultimum*. De ahí que no fuera extraño detectar estas dos especies bacterianas junto con el hongo en el frente de avance de la enfermedad.

P. putida, presenta sideróforos del grupo de las pioverdinas (fluorescente positiva – Tabla 3). Se cree que estos sideróforos producidos por esta especie tienen una gran importancia en el control biológico de los patógenos de plantas que habitan en el suelo. Sin embargo, a *P. putida* también se le atribuyen otros mecanismos de acción de control biológico de gran importancia, como son la producción de antibióticos, de HCN, competencia directa con el patógeno por nutrientes e inducción de resistencia adquirida a la planta tras la colonización de la raíz por dicha especie (Buysens *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 2000).

5.2. Implicaciones parasitarias de los microorganismos potencialmente patógenos

La identificación del tipo de agente causal de las podredumbres blandas constituye un proceso básico a la hora de prevenir y combatir las pérdidas que se producen tanto en campo como en comercialización de las frutas y hortalizas. Es por ello, por lo que se debe prestar especial atención a la hora de determinar si el agente patógeno primario es un hongo o una bacteria, ya que los tejidos muertos y macerados son invadidos por microorganismos oportunistas que, en la mayoría de los casos, proliferan enmascarando al verdadero agente causal de la enfermedad.

Entre los hongos que producen podredumbres blandas, destacan representantes de los géneros *Sclerotinia* y *Pythium*. Por otro lado, se han descrito numerosas especies

bacterianas patógenas asociadas directamente a las podredumbres bacterianas y que ya se han identificado y descrito en diversos apartados anteriores.

Las podredumbres bacterianas se distinguen de otras podredumbres ocasionadas por hongos como *Sclerotinia* sp. porque no se observa desarrollo de micelio fúngico, ni siquiera en condiciones de alta HR. Sólo, y como patógenos oportunistas o secundarios, se pueden desarrollar ciertos hongos sobre los tejidos macerados ya afectados, desarrollándose el micelio fúngico y ocultando el verdadero agente causal de la podredumbre (Ryall y Lipton, 1979). Esto se ha puesto de manifiesto por Martínez *et al.* (2003b) en podredumbre blanda bacteriana de la coliflor. Las podredumbres blandas por *Sclerotinia* sp. no producen olor, aun cuando el tejido esté totalmente descompuesto.

Como se ha discutido en apartados anteriores, en las muestras que se analizaron con los síntomas descritos, se aisló *P. ultimum* del frente de avance interno de la podredumbre, junto con bacterias de la especie *P. putida* y del género *Ochrobactrum*. Por ello, las pruebas de inoculación a fragmentos de tejido de tallos de brócoli se realizaron con estos tres microorganismos y sus combinaciones entre ellos.

Dado que el único organismo patógeno que se aisló del frente de avance de la enfermedad y del tejido macerado fue *P. ultimum*, constituye un indicio claro de que la enfermedad esté causada por este hongo. De hecho, se reprodujeron síntomas leves y medios en todas las inoculaciones donde el hongo estaba presente. En el resto de fragmentos se produjeron síntomas atípicos, como el pardeamiento del tejido en la zona de inoculación, posiblemente por oxidaciones de compuestos fenólicos, e incluso hipertrofia del tejido de la médula en las zonas próximas al punto de inoculación con *Pseudomonas putida*. Esta hipertrofia pudo ser debida a la producción de sustancias del crecimiento vegetal sintetizadas por la propia bacteria, ya que se ha demostrado que *P. putida* puede producir una hormona vegetal; el ácido indol-acético (AIA), capaz de estimular el crecimiento (Gravel *et al.*, 2007). La inducción a la síntesis de esta hormona estaría bloqueada por la presencia de *P. ultimum* u *Ochrobactrum* sp. Por otro lado, se ha demostrado un efecto sinérgico de *P. putida* con *P. ultimum* a la hora de colonizar los tejidos inoculados, puesto que la sintomatología fue más severa en este caso que cuando la pieza fue colonizada por el hongo sin la presencia de esta bacteria. Es difícil dar una interpretación a este resultado puesto que, *in vitro*, la bacteria parecía

tener un efecto retardador del crecimiento del hongo. Sin embargo, la severidad en el síntoma, medido por descomposición y color del tejido afectado, no debe reflejar necesariamente un mayor avance de la podredumbre, ya que, la médula estaba afectada totalmente en todos los casos en los que se inoculó al hongo (Figs. 17 y 18).

5.3. Perspectivas del desarrollo completo de la investigación en curso

Tanto los aislados de *P. ultimum*, como los bacterianos que presentaron actividad pectinolítica se guardan en la colección de microorganismos del Departamento de Producción Vegetal de la UPCT. Con el fin de que puedan ser estudiados *in vitro* e *in vivo*, haciendo, en este último caso, inoculaciones a tejidos sanos en fragmentos y en cultivos con el fin de comprobar las implicaciones parasitarias de estos aislados y sus posibles interacciones entre ellos para el establecimiento y desarrollo de la enfermedad. Con ello, se pretende finalmente hacer las pruebas de los postulados de Koch con el fin de caracterizar perfectamente la enfermedad y estudiar la influencia de los factores ambientales, varietales y culturales en el desarrollo de esta enfermedad. A este respecto, en la actualidad se están llevando a cabo los experimentos de inoculación en cultivos de brócoli para comprobar los postulados de Koch necesarios para completar el estudio de esta enfermedad. Los primeros resultados indican que estamos reproduciendo síntomas en los tallos que se han inoculado con el hongo, aunque estos síntomas son todavía muy leves y solamente se detectan un oscurecimiento de la médula de los tallos inoculados. El hongo se ha aislado del interior de estos tallos.

5.4. Conclusiones

1.- Realmente no se puede concretar la etiología de la enfermedad descrita en este trabajo a partir de la experimentación realizada hasta el momento. Lo que sí está claro, es que se ha encontrado una sintomatología y agentes patógenos asociados de distinta naturaleza. La prueba de inoculación a fragmentos de tejido ha reproducido la sintomatología, pero es necesario obtener los resultados de inoculación a planta en cultivo para intentar definir los postulados de Koch. Proceso que se está llevando a cabo en este momento.

2.- *Pythium ultimum* ha reproducido los síntomas leves y medios de la enfermedad en fragmentos de tejido, mientras que las bacterias ensayadas no lo han podido hacer. Este resultado sugiere que el hongo es el causante de la enfermedad o sintomatología descrita.

3.- Las bacterias aisladas del frente de avance interno de la podredumbre no causan la enfermedad, pero interfieren en el desarrollo del hongo, especialmente cuando crece *in vitro* con éste. De este modo *Ochrobactrum* sp. fue capaz de reducir el crecimiento de *P. ultimum*, por varios mecanismos: a) por la secreción de sustancias que interfieren en el crecimiento del hongo y b) por competencia directa por nutrientes o espacio. Sin embargo, *Pseudomonas putida* sólo interfirió significativamente con *P. ultimum* por competencia directa.

4.- De la conclusión anterior se desprende que *P. putida* interaccionó en menor medida que *Ochrobactrum* sp. con el hongo en su desarrollo. No obstante, agravó los síntomas causados por la colonización de los fragmentos de tejido por parte del hongo, siendo la combinación *P. ultimum* y *P. putida* la más agresiva.

5.- El resto de especies bacterianas encontradas en el tejido macerado de las plantas debían ser especies saprófitas que entraron al tejido por la vía de infección y se desarrollaron sobre el tejido muerto, ya macerado, incluido las dos especies pectinolíticas detectadas. Mientras que las especies *Ochrobactrum* sp. y *P. putida* llegaron a crecer conjuntamente con el hongo en el frente de avance de la podredumbre, área que carecía, o no se detectaron, especies bacterianas pectinolíticas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.R., Moss, M.O.** 1995. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 464 pp.
- Amer, GA; Utkhede, RS** 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Canadian journal of microbiology* 46 (9): 809–16.
- Andrés-Yeves, M.F., Arias, M., Bello, A., Borrueal, M.L., Fisac, R., Lacasa, A., López, M.M., Nombela, G., Noval, C., Rey, J.M., Tello, J., Valdeolivas, A. y Vares, F.** 1991. Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria.
- Arevalo-Ferro, C., Reil, G., Görg, A., Eberl, L., Riedel, K.** 2005. Biofilm formation of *Pseudomonas putida* IsoF: the role of quorum sensing as assessed by proteomics. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 87-114.
- Arsenijevic, M.** 1990. Bacterial pathogens the causal agents of cauliflower and lettuce heads rot in Yugoslavia. *Zastita bilja*, 41(1): 21-29.
- Barceló, J., Nicolás, G., Sabater, B. Sánchez, R.** 1998. Fisiología vegetal. Ediciones Pirámide, Madrid, 662 pp.
- Bartz, J.A., Eckert, J.W.** 1987. Bacterial diseases of vegetable crops after harvest. En: Postharvest Physiology of Vegetables. Editado por J. Weichmann II. Series: Food Science and Technology (Marcel Dekker, Inc.). Nueva York.
- Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J., Höfte, M.** 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3): 865-871.
- Canaday, C.H.** 1992. Effect of nitrogen fertilization on bacterial soft rot in two broccoli cultivars, one resistant and one susceptible to the disease. *Plant Disease*, 76(10): 989-991.
- CARM-** Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. 2010. www.carm.es/> Agricultura, Ganadería y Pesca.
- Casanova, E.** 1996. El cultivo de la lechuga en la Región de Murcia. *Agrícola Vergel* 15(178): 580-583.
- Cenis, J.L.** 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucl. Acids Res.* 20: 238.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B.N., Basnet M., Chakraborty, A.P.** 2009. Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 107:625-634.
- Chatterjee, A., Murata, A.H., McEvoy, J.L.** 1994. Global regulation of pectinases and other degradative enzymes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, the incitant of postharvest decay in vegetables. *HortScience* 29(7): 754-758.

- Clout, L.** «Broccoli beats heart disease», *Daily Express*, 5 September 2009.
- Drechsler, C.** 1925. *Pythium* infection of cabbage heads. *Phytopathology*, 15(8): 482-485.
- El-Mohamedy, R.S.R., El-Mougy, N.S.** 2009. Occurrence of *Pythium* rot of chinese cabbage in Egypt and its biocontrol measures. *Journal of Plant Protection Research*, 49(3): 309-318.
- Escrive, A.J., Artés, F., Martínez, J.A.** 1994. Alteraciones de origen patológico en la postrecolección: II Lechuga. *Phytoma* 54: 23-27.
- García, J.L., Díaz, E., Prieto, M.A., Miñambres, B., Galán, B., Zamarro, M.T., Fernández, C.** 2003. Biodegradación de compuestos aromáticos. XIX Congreso Nacional de Microbiología, Santiago de Compostela, Abstract, 59.
- Garrity, G.M., Holt, J.G.** 2001. The road map to the manual. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume one: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Second Edition. Eds.: Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. Springer, 119-166.
- Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R.J.** 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1968–1977
- Hao, Y.Y., Brackett, R.E.** 1994. Pectinase activity of vegetable spoilage bacteria in modified atmosphere. *Journal of Food Science* 1: 175-178.
- Hernández, J., Berria, D., Arteaga, G.** 1996. Bacterias patógenas de las plantas. *Agrícola Vergel* diciembre: 686-688.
- Hildebrand, P.D.** 1989. Surfactant-like characteristics and identify of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. *The Canadian Phytopathological Society*, 11 (3): 205-214.
- Holmes, B.** 2005. Genus III. *Ochrobactrum* Holmes, Popoff, Kiredjian and Kersters 1988, 412^{VP}. En: Bergey's Systematic Bacteriology. Volume 2. The Proteobacteria. Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, 2^a Ed. Eds.: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M. Springer, 1.388 pp.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T.** (Eds.). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9^a edición. 2000. Lippincott Williams & Wilkins, 767 pp.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods.** 1996. Lechugas. En: *El Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos. Su Aplicación a la Industria de Alimentos*. Siliker, J.H., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Roberts, T.A., and Tompkin, R.B. (eds.), Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 140-146.
- INFO** 2012. El Sector Agroalimentario en la Región de Murcia. Acceso en marzo 2014.
- Jay, J.M.** 1978. Modern Food Microbiology. 2^a Ed. Van Nostrand, New York, EE.UU., 479 p.
- Kirsh, V.A., Peters, U., Mayne, S.T., Subar, A.F., Chatterjee, N., Johnson, C.C., Hayes, R.B.** 2007. Prospective study of fruit and vegetable intakes and risk of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 99 (15): 1200–1209.

- Kubota, M., Tezuka, N., Abiko, K., Ishii, M.** 1995. *Pythium* rot of broccoli caused by *Pythium ultimum* Trow var. *ultimum*. *Ann. Phytopathol. Soc Jpn.*, 61: 503-506.
- Liao, C.H.** 2006. Bacterial soft rot. En: *Microbiology of Fruits and Vegetables*, Eds.: Sapers, G.M., Gorny, J.R., Yousef, A.E., CRC Taylor & Francis, 634 pp.
- Linares**, Brócoli, Ficha 32 UE, www.minec.gob.sv/. Acceso en febrero 2014.
- Llácer, G., López, M.M., Trapero, A., Bello, A.** (eds.) 1996 (Coedición 2000). *Patología vegetal*. Tomo I. Sociedad Española de Fitopatología, Phytoma y Mundi-Prensa. Madrid, España. 700 p.
- Lund, B.M.** 1983. Bacterial spoilage. En: *Post-harvest Pathology of Fruits and Vegetables*. Editor C. Dennis. Academic Press. Londres y Nueva York, 219 pp.
- Magnuson, J.A., King, A.D., Török, T.** 1990. Microflora of partially processed lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* 56(12): 3851-3854.
- Martínez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B., Fermaud M.** 2003a Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109:479-488.
- Martínez, J.A., Fernández, J.A., Carreño, S., González, A.** 2003b. Bacteriosis de la inflorescencia de la coliflor: etiología, patogénesis y métodos de control. *Agrícola Vergel*, 253: 18-28.
- Martínez, J.A., Navarro, A., Fernández, J.A., Bañón, S.** (2007). Using paclobutrazol to delay the growth of *Botrytis cinerea* isolated from *Chamaelaucium uncinatum*. *Australasian Plant Pathology*, 36:39-45.
- Martínez, J.A., Valdés, R., Vicente, M.J., Bañón, S.** (2008). Phenotypical differences among *B. cinerea* isolates from ornamental plants. *Comm. Appl. Biol. Ghent University*, 73(2):121-129.
- Martínez, J.A., Gómez-Bellot, M.J., Bañón, S.** (2009). Temperature-dependent growth of *Botrytis cinerea* isolates from potted plants. *Comm. Appl. Biol. Ghent University*, 74(3):729-738.
- Martínez J.A., Gómez-Bellot, M.J., Bañón, S.** (2011). Effects of calcium chloride on *Botrytis cinerea* isolates obtained from ornamental plants. *International Congress of Postharvest Pathology*, Lleida, Cataluña, Spain, pp. 11-14.
- Melgarejo, P., García-Jiménez, J., Jordá, M.C., López, M.M., Andrés, M.F., Duran-Vila, N.** 2010 *Patógenos de Plantas Descritos en España* (2ª ed.). Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, 854 pp.
- Miller, J.C., Miller, J.N.** *Estadística para Química Analítica*. Ed. Addison – Wesley Iberomaericana, 2ª ed.
- Montesinos, E., Beltrá, R.** 2000. Las bacterias fitopatógenas. En: *Patología Vegetal*. Tomo I. Eds.: Llácer, G., López, M.M., Trapero, A., Bello, A. Phytoma, Sociedad Española de Fitopatología y Mundi-Prensa, pp. 491-513.
- Müller, G.** 1981. *Microbiología de los Alimentos Vegetales*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 291 pp.

- Noval, C., Castro, S.** 1987. Bacteriosis de plantas hortícolas. Hojas Divulgadoras N° 4/87 HD, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España, 28 pp.
- Pérez, C., De la Fuente, L., Arias, A., Altier, N.** 2000. Uso de *Pseudomonas* fluorescentes nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus* L. *Agrociencia*, IV(1): 41-47.
- Ryall, A.L., Lipton, W.J.** 1979. Handling, Transportation and Storage of Fruits and Vegetables. Vol. I. Vegetables and Melons, 2ª edición, Avi Publishing Company, Westport, CT., EE.UU., 588 pp.
- Ryder, E.J.** 1979. Leafy Salad Vegetables. The Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, EE.UU., 266 pp.
- Sedki, R., El-Mohamedy, R.** 2012. Biological control of *Pythium* root of broccoli plants under greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Technology*, 8(3): 1017-1028.
- Smid, E.J., Jansen, A.H.J., Gorris, L.G.M.** 1994. Post-harvest pathology of the soft-rot bacterium *Erwinia carotovora*. The Post-Harvest Treatment of Fruit and Vegetables – Current Status and Future Prospects, Proceedings of the Sixth International Symposium of the European Concerted Action Program COST 94, 19-22 octubre 1994, Oosterbeek, Holanda, pp. 177-184.
- Snowdon, A.L.** 1990. A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Volume 1: General Introduction and Fruits. Wolfe Scientific Ltd., Cambridge, Reino Unido, 302 pp.
- Snowdon, A.L.** 1991. A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Volume 2: Vegetables. Wolfe Scientific Ltd., Cambridge, Reino Unido, 416 pp.
- Swinburne, T.R.** 1983. Quiescent infections in post-harvest diseases. En: *Post-Harvest Pathology of Fruits and Vegetables*. Dennis, C. (ed.), Academic Press, London, Reino Unido, pp. 1-21.
- Validov, S; Kamilova, F; Qi, S; Stephan, D; Wang, JJ; Makarova, N; Lugtenberg, B.** 2007. Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* in stonewool substrate". *Journal of applied microbiology* 102 (2): 461–71.
- Van der Plaats-Niterink, A.J.** (1981). Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21. CBS. 242 pp.
- Weisburg, W.G., Barns, S. M., Pelletier, D.A., Lane, D.J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173(2): 697.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. by Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ and TJ White. Academic Press, San Diego, CA, pp. 315–322.
- Zitter, T., Hopkins, D.L., Thomas, C.E.** 2004. Plagas y Enfermedades de las Cucurbitáceas. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 88 pp.