

## LOS MICROORGANISMOS AL SERVICIO DE LA AGRICULTURA: AGENTES MICROBIANOS DE CONTROL BIOLÓGICO (AMCB)

**Francisca Suárez Estrella y Joaquín Moreno Casco<sup>1</sup>**  
(Área de Microbiología. Savia Biotech SA)

### RESUMEN

En la actualidad, existe un interés creciente por la búsqueda de alternativas al control químico para la supresión de agentes patógenos vegetales y, en este sentido, una de las opciones más interesantes es el uso de agentes microbianos de control biológico (AMCB). La comercialización de estos agentes mediante bio-fórmulas es, en general, escasa debido a varias causas, como podría ser la falta de un espectro de actividad amplio, la baja eficacia del producto en campo, la actividad débil frente al patógeno en comparación con lo observado por parte de algunas fórmulas de naturaleza química o bien, el proceso de registro y patente tan lento al que deben someterse tales productos. No obstante, a pesar de las dificultades encontradas frente al desarrollo de estos bio-productos, existen muchas razones para ser optimistas ya que la aplicación de estos AMCB puede jugar un papel muy importante en los sistemas de control integrado de plagas y enfermedades.

### SUMMARY

*At present, there is a considerable interest in finding alternatives to chemical pesticides for suppression of soilborne plant pathogens. Therefore, one of the most interesting options is the use of microbial biological control agents (MBCA) suppressing plant diseases. The commercialization of these antagonistic microbes as bioformulations is, in general, scarce due to problems such as lack of broad-spectrum activity, low efficacy in the field, weakly suppressive activity when compared with chemical pesticides or the very slow registration process for the obtention of patents.*

<sup>1</sup> Catedrático de Microbiología de la Universidad de Almería. Asesor científico del Área de Microbiología de Savia Biotech SA.

## 1. Introducción

Resulta evidente que el buen desarrollo y estado sanitario de las plantas es especialmente importante para aquellos sectores empresariales relacionados directamente con la producción y distribución de productos vegetales. Adicionalmente, por su relación directa con la pureza y seguridad del medio ambiente y el consumo de productos alimentarios, la calidad higiénico-sanitaria vegetal puede ser considerada como un asunto de vital importancia a nivel mundial.

Las causas más comunes del crecimiento deficiente de las plantas y de la destrucción de cosechas son los agentes fitopatógenos, el clima desfavorable, las malezas y las plagas de insectos. Con respecto a la primera de ellas, existen gran cantidad de fitopatógenos que afectan desde hace más de 6.000 años, a la existencia, crecimiento adecuado y productividad de muchos de los cultivos vegetales en los que se basa el sustento y la supervivencia de la humanidad. En las sociedades más desarrolladas, los problemas observados en la producción de alimentos y forrajes a causa de plagas y enfermedades, tienen como primera consecuencia pérdidas financieras y precios más altos en los productos, más que problemas directos de desnutrición o inanición. Sin embargo, no debe obviarse que cualquier problema de producción en la industria agroalimentaria se traduce en una reducción en la disponibilidad de alimentos a nivel mundial, siendo las partes más pobres del mundo las más perjudicadas (Paddock, 1967 y Agrios, 1995).

En los últimos años se está llevando a cabo una mejora en los sistemas de producción agrícola sostenible, reduciendo en lo posible la aplicación de pesticidas químicos, los cuales resultan gravemente perjudiciales a nivel ambiental y sanitario. Se ha detectado además una problemática creciente en lo que se refiere a la resistencia de algunos patógenos frente a determinados pesticidas químicos (Brent y Hollomon, 1998), como es el caso del bromuro de metilo aplicado como fumigante del suelo frente a enfermedades típicas de cultivos vegetales y de tipo ornamental (Katan, 1999 y Gullino *et al.*, 2003).

Como consecuencia, la industria privada está incrementando sus actuales inversiones en relación al descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas que puedan ser aplicadas en el control de enfermedades de plantas. De hecho, existe la conciencia generalizada de que las estrategias que implican el manejo integrado de plagas, pueden proporcionar alternativas al control de patógenos, tanto respetuosas con el medio ambiente, como viables desde un punto de vista económico.

En este sentido, durante los últimos 40 años se han iniciado numerosos estudios dirigidos a la identificación de microorganismos capaces de reducir la actividad de patógenos del suelo por lo que, a día de hoy, existe un gran número de investigaciones relacionadas con las posibles interacciones entre agentes fitopatógenos y antagonistas. Algunas especies como *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* o en general, el grupo microbiano conocido como "Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal", se consideran hoy día, importantes agentes microbianos de control biológico (AMCB) o, como indican algunos autores, agentes "bioprotectores" de la salud vegetal. Dichos microorganismos atacan a las especies patógenas mediante distintos mecanismos de acción tales como la competencia por los nutrientes o el espacio físico, la producción de antibióticos, la presencia de sideróforos o mediante la activación de mecanismos de resistencia en el vegetal, lo que se conoce como resistencia sistémica inducida.

## 2. Prácticas agronómicas tradicionales dirigidas al control biológico de plagas

Los suelos supresivos naturales son un buen ejemplo de que, en ocasiones, la microbiota indígena es capaz de proteger a determinados cultivos vegetales de la acción perjudicial de algunos patógenos del suelo. Se han descrito suelos supresivos frente a un buen número de hongos fitopatógenos, tales como *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tricici*, *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*, entre otros (Scher y Baker, 1982; Alabouvette, 1986 y Lucas *et al.*, 1993). El carácter supresivo puede ser, además, inducido mediante la transferencia de este carácter de determinados microorganismos a sustratos "receptores" adecuados. En este sentido, el aislamiento de microorganismos antagonistas de enfermedades de plantas ha permitido la inoculación de suelos y sustratos que, sin ser inicialmente supresivos, han adoptado esta característica a posteriori.

Algunos biofungicidas comerciales se han desarrollado gracias al estudio de suelos de conocido carácter supresivo. A modo de ejemplo, éste es el caso de un biofungicida basado en la cepa K61 de *Streptomyces griseoviridis* (White *et al.*, 1990), procedente de turba, el cual es capaz de controlar las enfermedades producidas por los hongos patógenos *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Phytophthora* spp., mediante la colonización previa de la rizosfera vegetal. Por otro lado, a finales de la década de los

90, se desarrolló una cepa no patogénica (Fo47) de *F. oxysporum*, aislada a partir de un suelo supresivo para fusariosis en Francia, la cual se comercializa hoy día como una fórmula líquida que puede ser aplicada en cultivos sin suelo (Alabouvette *et al.*, 1998).

Desde hace más de 25 años, se conoce que la aplicación de enmiendas orgánicas tales como abonos en verde, estiércoles estables o compost, antes del transplante, pueden favorecer el control biológico de importantes plagas y enfermedades vegetales (Lumsden *et al.*, 1983). En este sentido, microorganismos presentes en compost de origen diverso muestran un notable carácter antagonista frente a enfermedades concretas, tales como el *damping-off* causado por *Pythium* spp. en plantas de pepino. Éste es el caso de algunas especies del grupo de las pseudomonas fluorescentes, así como de los géneros *Bacillus* y *Pantoea* (Boehm *et al.*, 1997). Los compost aplicados a suelos con este objetivo, suponen además una fuente importante de nutrientes para los antagonistas, favoreciendo la óptima interacción de éstos con la microbiota autóctona (Hoitink y Boehm, 1999).

Se conocen al menos dos tipos de mecanismos por los que un compost podría considerarse como supresivo: a) competición por los nutrientes entre los agentes fitopatógenos y la microbiota propia del compost, o b) de forma más específica, los fenómenos de microparasitismo entre antagonistas y patógenos. El primero de ellos es el que opera principalmente frente a *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp. (Hoitink *et al.*, 1991), mientras que el segundo se requiere principalmente para el control de *Rhizoctonia solani* (Hoitink *et al.*, 1997).

El ambiente controlado y homogéneo que impera en un invernadero, se considera el idóneo para la aplicación de AMCB. Los antagonistas que se utilizan en este tipo de ambientes deben seleccionarse en función de las condiciones óptimas ambientales de crecimiento del cultivo, tales como el pH, temperatura o los potenciales matriciales (Albajes *et al.*, 1999 y Paulitz y Bélanger, 2001). En este sentido, incluso las prácticas cultivares y enmiendas orgánicas aplicadas para inducir la supresión de enfermedades en suelo o cultivo hidropónico, resultan sorprendentemente más efectivas en el invernadero que al aire libre.

### 3. Búsqueda, aislamiento e identificación de agentes de control biológico

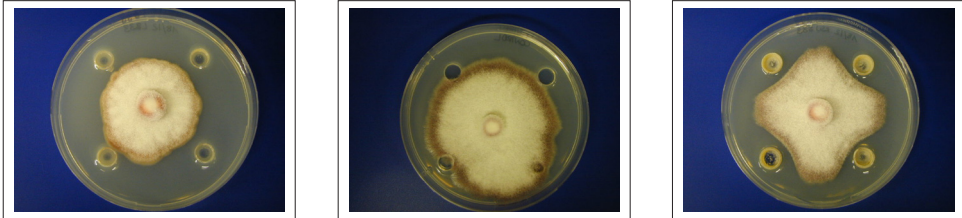
El primer paso en el desarrollo de AMCB es la búsqueda, aislamiento y verificación de su carácter antagonista mediante métodos que aseguren la eficacia y en última instancia el éxito comercial de los mismos. La metodología utilizada, por tanto, va a determinar de forma importante el tipo y propiedades de los antagonistas que se seleccionen.

En general, se suele llevar a cabo una búsqueda "masiva" de agentes potencialmente antagonistas a partir de los sustratos donde éstos se encuentran presentes (suelos, compost, restos vegetales). Los extractos obtenidos a partir de estos sustratos, se inoculan sobre medios de cultivo dirigidos al crecimiento de bacterias, hongos y actinomicetos, los cuales posteriormente serán ensayados con el objetivo de seleccionar aquellos que muestren algún efecto antagonista frente a uno o más agentes fitopatógenos.

Los ensayos *in vivo* necesarios para comprobar si un determinado microorganismo es capaz de suprimir una enfermedad vegetal son bastante engorrosos y ocupan largos periodos de tiempo. De este modo, cuando se pretende investigar un gran número de cepas potencialmente antagonistas se requiere, por tanto, llevar a cabo ensayos preliminares que ayuden a realizar una preselección de aquellos microorganismos que realmente, deberán ser probados en campo. Algunas de las técnicas más utilizadas para comprobar el carácter más o menos antagonista de un microorganismo se basan en la modificación de los protocolos de enfrentamiento descritos por De Boer *et al.* (1999) y Landa *et al.*, (1997) (Figura 1). Por otro lado, cuando el agente de control biológico pasa a ser investigado en planta, una de las metodologías más utilizadas *in vivo* se basa en la inducción de la resistencia sistémica del cultivo receptor (Larkin y Fravel, 1998) por parte del agente antagonista.

Algunas estrategias tradicionales, aunque más relacionadas con el control de patógenos post-cosecha, pasan por la utilización de productos vegetales lesionados o heridos (frutas, verduras, hortalizas) de modo que se seleccionan aquellos agentes de control biológico cercanos a las lesiones y que son capaces de proteger al vegetal de la entrada de patógenos oportunistas (Wilson *et al.*, 1993). Este método permite la selección en un tiempo mínimo de un buen número de antagonistas, aunque se limita sólo a aquéllos de crecimiento rápido y que crecen sobre la superficie del producto vegetal (El Ghaouth *et al.*, 2000).

Figura 1. Enfrentamiento entre agentes antagonistas y el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (foto central: control de crecimiento de Fom)



Sea cual sea el método de búsqueda y selección de AMCB, hay que tener en cuenta que no siempre los resultados obtenidos *in vivo*, van a coincidir con lo observado *in vitro*, dentro del laboratorio. Aunque esto sería lo deseable, es evidente que las condiciones *in vitro* son muy diferentes a las que se dan en el campo o en un invernadero, tanto en lo que se refiere a las características físico-químicas del entorno, como a las posibles interacciones que se establecen entre antagonista-hospedador-patógeno (Droby et alii, 2000 y Wisniewski *et alii*, 2001).

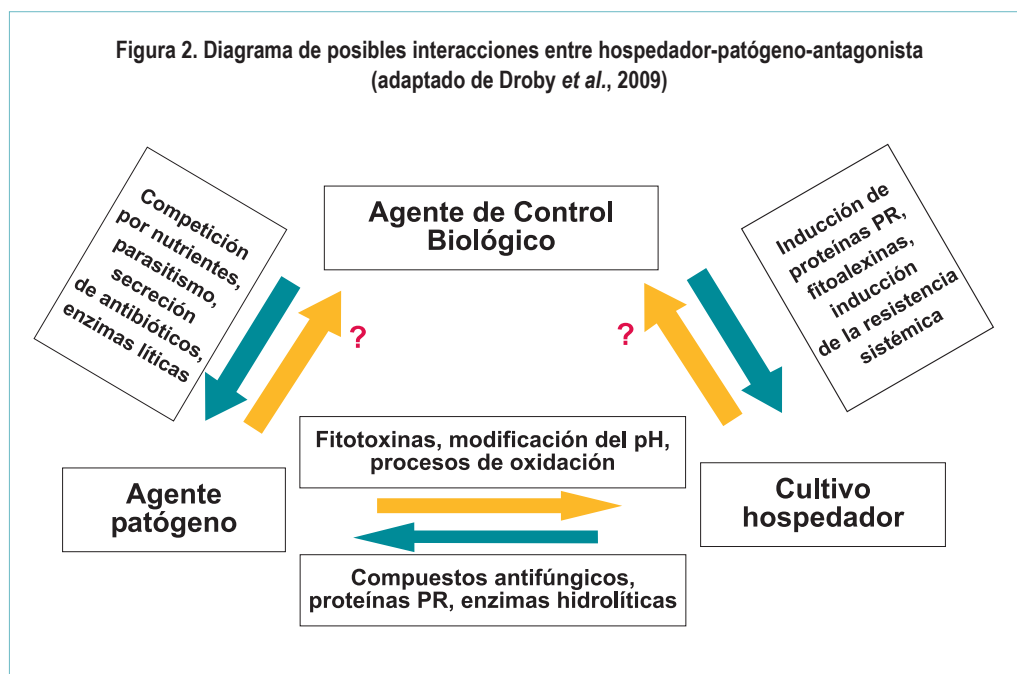
### 3.1. Mecanismos de acción

Mientras que la competición por nutrientes parece ser el principal mecanismo implicado en la actividad de muchos agentes antagonistas, resulta raro que ésta, de forma aislada, sea la única responsable de la supresión de una enfermedad (Droby *et al.*, 2000 y Janisiewicz *et al.*, 2000). Un buen AMCB debe estar equipado con varios atributos que en conjunto sean capaces de controlar el desarrollo de una determinada enfermedad.

Los mecanismos por los que los microorganismos antagonistas afectan a las poblaciones de patógenos no siempre son claros, pero en general se atribuyen a alguno de los siguientes factores: parasitismo directo y muerte del patógeno (Bar-Shimon *et al.*, 2004 y Friel *et al.*, 2007); competencia con el patógeno por alimento (Wisniewski *et al.*, 2001 y 2007); efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista tales como estreptomycin, griseofulvina, cicloheximida, tetraciclina o penicilina (Janisiewicz *et al.*, 2001); y efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista (Fernando *et al.*, 2005).

Algunos cultivos pueden ser protegidos por agentes de control biológico de naturaleza fúngica gracias a mecanismos de resistencia inducida (Gessler y Kuc, 1982 y Matta, 1989). En este sentido, diversas investigaciones han demostrado la inducción de resistencia a *Fusarium* spp. mediante la utilización de cepas de *F. oxysporum* no patógenas en el caso del cultivo de pepino y guisante.

Conocer, por tanto, los mecanismos implicados en la protección de los cultivos es una condición preliminar e indispensable para el desarrollo y posterior uso efectivo de productos basados en AMCB. Sin embargo, la información acerca de los mecanismos de acción propios de la mayoría de los agentes de control investigados hasta el momento es muy incompleta. Esto se debe a las dificultades asociadas al estudio de las complejas interacciones entre hospedador, patógeno y antagonista, sin olvidar al resto de la microbiota que habita en el mismo entorno (Figura 2).



## 4. Comercialización de productos dirigidos al control biológico

A pesar de la enorme importancia que hoy día supone el desarrollo de un sistema integrado óptimo para el control de plagas, mediante la aplicación de AMCB, los biopesticidas representan hoy día menos de un 3% del mercado global de pesticidas (Marrone, 2007). Aunque existe un considerable interés en la búsqueda de alternativas al control químico para la supresión de fitopatógenos, la comercialización de estos agentes de control es, en general escasa, debido a problemas tales como la detección de un espectro de actuación muy limitado, la baja eficacia del producto en campo o una muy baja actividad supresiva en comparación a lo observado con los pesticidas químicos (Spadaro y Gullino, 2005).

Por tanto, la búsqueda de microorganismos que no sólo sean capaces de controlar plagas y enfermedades de plantas, sino que además muestren un amplio espectro de actuación *in vivo*, es una de las actividades en las que la industria agraria privada invierte actualmente gran cantidad de personal, tiempo y fondos.

### 4.1. La base de un correcto programa de investigación

La identificación, desarrollo, y comercialización de una biofórmula dirigida al control biológico es un proceso largo y costoso (Droby *et al.*, 2000 y Blachinsky *et al.*, 2007) y, por tanto, en las etapas iniciales del desarrollo de un producto de este tipo, los investigadores deben emplear el tiempo y esfuerzo necesarios para vislumbrar cualquier problema que suponga un obstáculo para la comercialización del producto.

Ya a finales de los 80, Wilson y Wisniewski (1989) establecieron una serie de criterios relacionados con la mayor o menor idoneidad de un AMCB. Estos criterios se enumeran a continuación:

- Estabilidad genética.
- Efectividad a bajas concentraciones.
- Requerimientos nutricionales poco o nada complejos.
- Capacidad de supervivencia bajo condiciones ambientales adversas.



- Efectividad frente a un amplio rango de patógenos y sobre diferentes cultivos vegetales.
- Economía de producción.
- Posibilidad de obtener biofórmulas con un tiempo de vida largo.
- Facilidad de aplicación.
- Resistencia a otros agentes químicos usados en campo.
- Inocuidad para el hombre.

En general, todos estos criterios se agrupan en 5 factores bien diferenciados: 1) la bioseguridad que ofrece el antagonista seleccionado; 2) la posibilidad de ser patentado; 3) los requerimientos nutricionales y tiempo límite de vida (caducidad); 4) el rango de actividad (cultivos vegetales y patógenos); y, finalmente, 5) la facilidad de la aplicación. Si cualquiera de estos factores ofreciese problemas, las empresas encargadas del desarrollo de biofórmulas antagonistas no dudarían en abandonar el desarrollo de un producto de este tipo, a pesar de que el antagonista seleccionado haya mostrado previamente, una excelente capacidad antagonista *in vitro*.

## 4.2. Aplicación de las biofórmulas antagonistas

El formato de los distintos preparados comerciales va a depender en gran medida del uso o aplicación que se le vaya a dar. Así, para la aplicación en cultivos sin suelo, es preferible el uso de biofórmulas líquidas, ya que lo más sencillo y lógico es aplicar el inóculo mediante el sistema de riego controlado. Por otro lado, cuando la aplicación va a llevarse a cabo en maceteros contenedores, sobre el propio sustrato de crecimiento, lo más apropiado es el uso de materiales granulados. En el caso de ser aplicados mediante aerosoles (aplicación foliar) o bien mediante inmersión radical, la utilización de polvos hidrosolubles es el método de elección. Existen algunos productos que tienen la posibilidad de poder ser aplicados con un objetivo doble. Éste es el caso de una biofórmula basada en la actividad antagonista del hongo *Coniothyrium minitans*, de modo que es aplicada en suelo para reducir el inóculo del fitopatógeno o bien a modo de *spray* para higienizar los cultivos o restos vegetales infectados (De Vrije *et al.*, 2001).

En general, una vez formulados, este tipo de bioproductos contienen un conjunto de componentes diversos tales como la propia matriz sobre la que se han elaborado, aditivos, estabilizantes, inhibidores del crecimiento, agentes controladores del pH, dispersantes, lubricantes, sustancias activadoras, nutrientes, etc. (Paau, 1998). El objetivo de añadir tales componentes se basa en el mantenimiento de la viabilidad del microorganismo antagonista y en favorecer y promover su capacidad de actuación, así como en facilitar la manipulación y dosificación del producto sin olvidar la necesidad de evitar los riesgos de contaminación por parte de agentes externos.

Hoy día, el estudio de la aplicación y dosificación de las biofórmulas basadas en AMCB, merece una atención especial. En este sentido, la dosificación debe ser sencilla y efectiva, debiendo llevarse a cabo en el momento y sitio de acción apropiados. Estos productos se basan en la presencia de organismos vivos, los cuales pueden verse mucho más afectados que los pesticidas químicos a causa de los cambios ambientales de temperatura, humedad y/o pH (Matthews, 2000).

### **4.3. Problemas derivados del Registro y Patente de los agentes de control biológico**

Tras el estudio de un agente antagonista, desarrollo de la biofórmula óptima y finalmente aplicación experimental, el producto será o no, susceptible de comercializarse. Los requerimientos más importantes para registrar definitivamente el producto son su viabilidad económica, evidenciar su eficiencia y reproducibilidad bajo diferentes condiciones ambientales, el tiempo de vida, así como la viabilidad de su aplicación y dosificación. Sin embargo, no son estos los únicos factores a tener en cuenta, ya que las perspectivas de distribución y venta del producto son dos aspectos evaluados de forma minuciosa (Serrano y Galindo, 2007).

Hoy día, existe un interés considerable en el descubrimiento y explotación de nuevos AMCB, para el control de plagas y enfermedades vegetales así como de malas hierbas. El uso de este tipo de productos puede llevarse a cabo en aquellas zonas donde la aplicación de pesticidas químicos esté prohibida, o bien donde determinados cultivos hayan generado resistencias a éstos. Sin embargo, a pesar del esfuerzo llevado a cabo actualmente, el número de productos de este tipo en el mercado europeo es aún muy bajo en comparación con el observado en EEUU o Canadá (Kiewnick, 2007), debido principalmente al bajo número de registros que se producen anualmente.

En la mayor parte de los países occidentales el proceso de registro de un agente de control biológico requiere de evaluaciones menos intensivas que las necesarias para un pesticida o antimicrobiano químico. Sin embargo el tiempo invertido y los costes derivados del registro son muy altos, por lo que se hace imprescindible la protección de la tecnología mediante patentes, siendo éste un proceso largo y complejo (Kiewnick, 2007).

En los países miembros de la UE, el registro de productos dirigidos al control biológico se regula mediante la Directiva 91/414/EEC. El largo y costoso proceso de registro y patente de estos bioproductos obliga a la mayoría de las empresas, a suspender o frenar los esfuerzos dirigidos a la investigación y desarrollo de nuevas biofórmulas. Este es el motivo por el que, tanto empresarios, como científicos, autoridades reguladoras y responsables en política medio ambiental, reclaman hoy día la agilización de tales procesos, con el objetivo de acelerar la introducción en el mercado de nuevos AMCB (Kiewnick, 2007).

Por otra parte, aunque una formulación antagonista fuese finalmente, más efectiva que un producto químico para el control de un determinado patógeno, su comercialización podría verse limitada si el mercado no es lo suficientemente grande para justificar los altos costos derivados de su registro. Para recuperar dicha inversión, el empresario debería centrarse en el desarrollo y protección de productos con el máximo espectro de actuación y bajo diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, salvo contadas ocasiones, éste no es el caso de la mayoría de los AMCB conocidos (Serrano y Galindo, 2007).

No obstante, a pesar de las dificultades encontradas para el desarrollo de bioproductos antagonistas, no se debe ser pesimista en este sentido. Los avances en este campo se dirigen a la búsqueda de estrategias que aceleren la producción, comercialización y por supuesto la aceptación por parte del agricultor y consumidor de la efectividad de este tipo de productos y alternativas de control. En este sentido, la utilización de AMCB podría jugar un importante papel en la protección de cultivos, como un factor clave dentro de los programas de control integrado de plagas.

La combinación de 2 ó más antagonistas, la modificación genética de los mismos, así como la aplicación de nuevas tecnologías y procedimientos dirigidos al aumento de la producción y bioformulación de estos productos, suponen, hoy día, líneas de investigación cuyo objetivo es seguir avanzando en este extenso y poco explotado mundo de los agentes microbianos de control biológico.

## Referencias bibliográficas

- AGRIOS, G. N. (1995): *Fitopatología*. México, Noriega Editores.
- ALABOUVETTE, C. (1986): "Fusarium wilt-suppressive soils from the Chateau-renard region: review of a 10-year study"; en *Agronomie* (6); pp. 273-284.
- ALABOUVETTE, C.; SCHIPPERS, B.; LEMANCEAU, P. y BAKKER, P. (1998): "Biological control of Fusarium wilts: toward development of commercial products"; en BOLAND, G. J. y KUYKENDALL, L. D., dirs.: *Plant-Microbe interactions and Biological Control*. Nueva York, Marcel Dekker; pp. 15-36.
- ALBAJES, R.; GULLINO, M. L.; VAN LENTEREN, J. C. y ELAD, Y. (1999): *Integrated Pest and Diseases Management in Greenhouse Crops*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M. y DROBY, S. (2004): "Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*"; en *Current Genetic* (45); pp. 140-148.
- BLACHINSKY, D.; ANTONOV, J.; BERCOVITZ, A.; ELAD, B.; FELDMAN, K.; HUSID, A.; LAZARE, M.; MARCOV, N.; SHAMAI, I.; KEREN-ZUR, M. y DROBY, S. (2007): "Commercial applications of 'Shemer' for the control of pre- and postharvest diseases"; en *IOBCWPRS Bulletin* (30); pp. 75-78.
- BOEHM, M. J.; WU, T.; STONE, A. G.; KRAAKMAN, B.; IANNOTTI, D. A., et alii (1997): "Cross-polarized magic-angle spinning <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization of soil organic matter relative to culturable bacterial species composition and sustained biological control of Pythium root rot"; en *Applied Environmental Microbiology* (63); pp. 162-168.
- BRENT, K. J. y HOLLOMON, D. W. (1998): *Fungicide resistance: the assessment of risk*. Bruselas, FRAC.
- DE BOER, M.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L. C. y BAKKER, P. (1999): "Combining fluorescent Pseudomonas spp. strains to enhance suppression of Fusarium wilt of radish"; en *European Journal of Plant Pathology* (105); pp. 201-210.

- DE VRIJE, T.; ANTOINE, N.; BUITELAAR, R. M.; BRUCKNER, S.; DISSEVELT, M.; DURAND, A.; GERLAGH, M.; JONES, E. E.; LUTH, P.; OOSTRA, J.; RAVENSBERG, W. J.; RENAUD, R.; RINZEMA, A.; WEBER, F. J. y WHIPPS, J. M. (2001): "The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing"; en *Applied Microbiological Biotechnology* (56); pp. 58-68.
- DROBY, S.; WILSON, C.; WISNIEWSKI, M. y EL GHAOUTH, A. (2000): "Biologically based technology for the control of postharvest diseases of fruits and vegetables"; en WILSON, C. y DROBY, S., dir.: *Microbial Food Contamination*. Florida, CRC Press; pp. 187-206.
- DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; MACARISIN, D. y WILSON, C. (en prensa): "Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm?"; en *Postharvest Biology and Technology*.
- EL GHAOUTH, A.; SMILANICK, J. L.; WISNIEWSKI, M. y WILSON, C. L. (2000): "Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-d-glucose"; en *Plant Diseases* (84); pp. 249-253.
- FERNANDO, W.; RAMARATHNAM, R.; KRISHNAMOORTHY, A. y SAVCHUK, S. (2005): "Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol"; en *Soil Biology & Biochemistry* (37); pp. 955-964.
- FRIEL, D.; GÓMEZ PESSOA, N.; VANDENBOL, M. y JIJAKLI, H. (2007): "Separate and combined disruptions of two *exo-1,3*-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (Strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple"; en *Molecular Plant Microbe Interaction* (20); pp. 371-379.
- GULLINO, M.; CAMPONOGARA, A.; GASPARRINI, G.; RIZZO, V.; CLINI, C. y GARIBALDI, A. (2003): "Replacing methyl bromide for soil disinfestation: the Italian Experience and implications for other countries"; en *Plant Diseases* (87); pp. 1.012-1.021.
- HOITINK, H.; INBAR, Y. y BOEHM, M. (1991): "Status of compostamended potting mixes naturally suppressive to soilborne diseases of floricultural crops"; en *Plant Diseases* (75); pp. 869-873.

- HOITINK, H.; STONE, A. y HAN, D. (1997): "Suppression of plant diseases by composts"; en *HortScience* (32); pp. 184-187.
- HOITINK, H. y BOEHM, M. (1999): "Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate dependent phenomenon"; en *Annual Review of Phytopathology* (37); pp. 427-446.
- JANISIEWICZ, W. J.; TWORKOSKI, T. J. y KURTZMAN, C. P. (2001): "Biocontrol potential of *Mechnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple"; en *Phytopathology* (91); pp. 1.098-1.108.
- KATAN, J. (1999): "The methyl bromide issue. Problems and potential solutions"; en *Journal of Plant Pathology* (81); pp. 153-159.
- KIEWNICK, S. (2007): "Practicalities of developing and registering microbial biological control agents"; en *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* (2) 013.
- GESSLER C. y KUC J. (1982): "Induction of resistance to *Fusarium* wilt in cucumber by root and foliar pathogens"; en *Phytopathology* 72 (11); pp. 1.439-1.441.
- LANDA, B. B.; HERVÁS, A.; BETTIOL, W. y JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. (1997): "Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*"; en *Phytoparasitica* (25); pp. 305-318.
- LARKIN, R. P. y FRAVEL, D. R. (1998): "Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato"; en *Plant Diseases* (82); pp. 1.022-1.028.
- LUCAS, P.; SMILEY, R. W. y COLLINS, H. P. (1993): "Decline of *Rhizoctonia* root rot on wheat in soils infested with *Rhizoctonia solani* AG-8"; en *Phytopathology* (83); pp. 260-265.
- LUMSDEN, R. D., LEWIS, J. A. y MILLNER, P. D. (1983): "Effect of composted sewage sludge on several soilborne plant pathogens and diseases"; en *Phytopathology* (73); pp. 1.543-1.548.

- MARRONE, P. M. (2007): "Barriers to adoption of biological control agents and biological pesticides"; en CAB Reviews; *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* (2) 051.
- MATTA, A. (1989): "Induced resistance to Fusarium wilt diseases"; en TJAMOS, E. C y BECKMAN, C. H., dirs.: *Vascular wilt diseases of plants. Basic studies and control*. Berlín, Springer; pp. 175-196.
- MATTHEWS, G. A. (2000): *Pesticide Application Methods*. Oxford, Blackwell Science Ltd.
- PAAU, A. S. (1998): "Formulation of beneficial organisms applied to soil"; en BURGESS, H. D., dir.: *Formulation of microbial biopesticides*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers; pp. 235-254.
- PADDOCK, W. C., (1967): "Phytopathology in a hungry world"; en *Annual Review of Phytopathology* (5), pp. 375-390.
- PAULITZ, T. C. y BÉLANGER, R. R. (2001): "Biological control in greenhouse systems"; en *Annual of Review Phytopathology* (39); pp. 103-133.
- SCHER, F. M. y BAKER, R. (1982): "Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of suppressiveness to usarium wilt pathogens"; en *Phytopathology* (72); pp. 1.567-1.573.
- SERRANO, L. y GALINDO, E. (2007): "Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario"; en *Ciencia* 77-87.
- SPADARO, D. y GULLINO, M. L. (2005): "Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens"; en *Crop Protection* (24); pp. 601-613.
- WHITE, J. G.; LINFIELD, C. A.; LAHDENPERA, M. L. y UOTI, J. (1990): "Mycostop: A novel biofungicide based on *Streptomyces griseoviridis*"; en *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases* (1); pp. 221-226.

- WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. y CHALUTZ, E. (1993): "A selection strategy for microbial antagonist to control postharvest diseases of fruits and vegetables"; en *Scientia Horticulturae* (53); pp. 183-189.
- WILSON, C. L. y WISNIEWSKI, M. (1989): "Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology"; en *Annual Review of Phytopathology* (27); pp. 425-441.
- WISNIEWSKI, M.; WILSON, C.; EL GHAOUTH, A. y DROBY, S. (2001): "Non-chemical approaches to postharvest disease control"; en *Acta Horticulturae* (553); pp. 407-412.
- WISNIEWSKI, M.; WILSON, C.; DROBY, S.; CHALUTZ, E.; EL GHAOUTH, A. y STEVENS, C. (2007): "Postharvest biocontrol: new concepts and applications"; en VINCENT, C.; GOETTEL, M. S. y LAZAROVITS, G., dir.: *Biological Control A Global Perspective*. Cambridge, CABI; pp. 262-273.