



universidad
de león

ESCUELA DE INGENIERÍA AGRARIA Y FORESTAL

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN INGENIERÍA AGRARIA

MENCIÓN EN INGENIERÍA AGROAMBIENTAL

**EFFECTO DE AGENTES DE BIOCONTROL SOBRE *PSEUDOMONAS SYRINGAE*
PV. *PHASEOLICOLA* (“GRASA DE LA ALUBIA”) EN VAINAS DE *PHASEOLUS*
*VULGARIS***

***EFFECT OF BIOCONTROL AGENTS ON PSEUDOMONAS SYRINGAE PV.*
*PHASEOLICOLA (“HALO BLIGHT”) IN PHASEOLUS VULGARIS PODS***

Lucía Arancio Prieto

Tutoras: Sara Mayo Prieto, Alicia Lorenzana de la Varga

León, Julio 2023

ANEXO 7. HOJA DE COMPROBACIÓN

TRABAJOS DE CARÁCTER CIENTÍFICO O TÉCNICO

Título: EFECTO DE AGENTES DE BIOCONTROL SOBRE PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. PHASEOLICOLA ("GRASA DE LA ALUBIA") EN VAINAS DE PHASEOLUS VULGARIS

Autor: Lucía Arancio Prieto

ELEMENTOS DE OBLIGADA APARICIÓN

- Resumen.** De 400 palabras como máximo.
- Introducción.** Debe incluir los motivos por los que se realiza el trabajo y los antecedentes o estudios previos sobre el mismo.
- Objetivos.** Se detallarán de forma clara y concisa los objetivos que se pretenden alcanzar.
- Material y Métodos / Metodología.** Descripción de las técnicas, los materiales empleados, y los métodos de análisis de datos, de forma que se garantice la repetibilidad de los mismos.
- Resultados / Análisis / Diagnóstico.** La información obtenida con el estudio se presentará de forma sistemática, preferentemente mediante tablas y figuras que deberán ser en todo caso autoexplicativas, y deberán aparecer debidamente numeradas y referenciadas en un índice propio.
- Discusión.** Los resultados propios del trabajo deberán ser discutidos relacionándolos, en su caso, con otros de estudios precedentes.
- Conclusiones.** Deberán ser claras, concisas, y coherentes con los objetivos propuestos. En el caso planes de ordenación de recursos forestales, propuestas concretas con objetivos, líneas y medidas.
- Planos / Mapas.** Serán obligatorios en trabajos topográficos, estudios de implantación de cultivos o transformaciones de explotaciones, y en general, cualquier trabajo técnico o científico asociado a áreas, parcelas, o territorios determinados.
- Bibliografía.** Listado de las fuentes de información utilizadas debidamente referenciadas y ordenadas.

<p>REALIZADA LA COMPROBACIÓN <input checked="" type="checkbox"/></p> <p><input checked="" type="checkbox"/></p>	<p>El tutor/es:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>MAYO PRIETO SARA - 71440764G</p> <p>Firmado digitalmente por MAYO PRIETO SARA - 71440764G Fecha: 2023.07.10 13:54:50 +02'00'</p> <p>Fdo.: Sara Mayo Prieto</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>LOREZANA DE LA VARGA ALICIA - 09798181C</p> <p>Firmado digitalmente por LOREZANA DE LA VARGA ALICIA - 09798181C Fecha: 2023.07.10 12:03:23 +02'00'</p> <p>Fdo.: Alicia Lorenzana de la Varga</p> </div> </div>
---	---

RESUMEN

La ‘grasa de la alubia’ o ‘grasa de la judía’, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, es una enfermedad que afecta a las judías, *Phaseolus vulgaris*, causando en las vainas manchas aceitosas, y en sus hojas manchas cloróticas.

El cultivo de judía grano es de gran importancia para la provincia de León, contando con el sello de calidad de la Indicación Geográfica Protegida “Alubia de La Bañeza – León”. Una de las enfermedades más importantes que afecta a este cultivo es la grasa de la alubia. Debido a las resistencias desarrolladas a ciertos productos y a la falta de materias activas autorizadas para el control de este problema, es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias de control, como los agentes de control biológicos.

Se han probado en este estudio 7 agentes de control distintos, pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Trichoderma*, y los metabolitos que producen en un ensayo *in vivo* sobre vainas de judía, con el objetivo de medir los halos provocados por el patógeno en torno al punto de inoculación. Se han obtenido resultados favorables en 7 del total de los 14 tratamientos aplicados.

Estos resultados demuestran que es posible el control de *P. syringae* pv. *phaseolicola* gracias a agentes de control biológico, abriendo camino a futuras investigaciones sobre sus modos de actuación y su efectividad en campo.

Palabras clave: ensayo *in vivo*, metabolitos, *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Evolución del cultivo de la judía grano (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	8
1.1.1. <i>La judía en el mundo</i>	8
1.1.2. <i>La judía en España</i>	10
1.1.3. <i>La judía en León</i>	12
1.2. Taxonomía y descripción botánica de la judía	13
1.2.1. <i>Raíz</i>	13
1.2.2. <i>Tallo</i>	14
1.2.3. <i>Hojas</i>	16
1.2.4. <i>Inflorescencia</i>	16
1.2.5. <i>Fruto</i>	17
1.2.6. <i>Semillas</i>	18
1.3. Manejo agronómico de la judía	18
1.3.1. <i>Suelos</i>	18
1.3.2. <i>Clima</i>	18
1.3.3. <i>Siembra</i>	19
1.3.4. <i>Cuidado del cultivo</i>	19
1.3.5. <i>Cosecha</i>	19
1.4. La grasa de la judía (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>).....	20
1.4.1. <i>Taxonomía y morfología</i>	20
1.4.2. <i>Síntomas y daños en judía</i>	21
1.4.3. <i>Control en judía</i>	22
1.5. Agentes de biocontrol.....	22
1.5.1. <i>Antecedentes y relevancia</i>	22
1.5.2. <i>Trichoderma</i>	23

1.5.3.	<i>Bacillus</i>	27
1.5.4.	<i>Pantoea</i>	29
1.5.5.	<i>Pseudomonas</i>	30
2.	OBJETIVOS	33
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	34
3.1.	Material	34
3.2.	Método	35
3.2.1.	<i>Diseño experimental</i>	35
3.2.2.	<i>Esporas de Trichoderma spp.</i>	36
3.2.3.	<i>Obtención de metabolitos de Trichoderma spp.</i>	37
3.2.4.	<i>Bacterias de control biológico.</i>	37
3.2.5.	<i>Obtención de metabolitos de las bacterias de control biológico.</i>	38
3.2.6.	<i>Obtención de Pseudomonas syringae pv. phaseolicola para su aplicación.</i>	38
3.2.7.	<i>Inoculación y evaluación en vainas de judía.</i>	38
3.2.8.	<i>Análisis estadísticos</i>	40
4.	RESULTADOS	41
5.	DISCUSIÓN	46
6.	CONCLUSIONES	51
7.	BIBLIOGRAFÍA	52

Índice de figuras

Figura 1. Evolución de la superficie (color azul, en millones de hectáreas), producción (color naranja, en millones de toneladas) del cultivo de la judía grano a nivel mundial desde 1961 hasta la actualidad (FAO, 2022).....	8
Figura 2. Evolución del rendimiento (kg/ha) del cultivo de la judía grano a nivel mundial desde 1961 hasta la actualidad (FAO, 2022).	9
Figura 3. Producción (%) mundial por continentes de judía grano en 2021 (FAO, 2022).....	9
Figura 4. Evolución de la superficie (color azul, miles de hectáreas) y producción (color naranja, miles de toneladas) en España del cultivo de judía grano desde 1961 hasta la actualidad (FAO, 2022).....	10
Figura 5. Evolución del rendimiento (kg/ha) en España del cultivo de judía grano desde 1961 hasta la actualidad(FAO, 2022).....	10
Figura 6. Superficie cultivada (%) de judía en 2021 en España por Comunidades Autónomas (MAPA, 2021).....	11
Figura 7. Superficie cultivada (%) de judía en Castilla y León por provincias en 2021 (MAPA, 2021). .	11
Figura 8. Variedades Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) “Alubia de La Bañeza-León”. Elaboración propia a partir de Consejo Regulador de la I.G.P. «Alubia de La Bañeza-León», 2023.....	12
Figura 9. Distintas variedades de judías encontradas habitualmente en el mercado. Elaboración propia.	12
Figura 10. Taxonomía de <i>Phaseolus vulgaris</i> (Reinoso Sánchez <i>et al.</i> , 2022).	13
Figura 11. Sistema radicular inicial de <i>P. vulgaris</i> (Arias Restrepo <i>et al.</i> , 2007).	13
Figura 12. Raíz completamente desarrollada de una planta de judía (<i>P. vulgaris</i>) (Arias Restrepo <i>et al.</i> , 2007).....	14
Figura 13. Tallo de planta de judía (<i>P. vulgaris</i>)(Arias Restrepo <i>et al.</i> , 2007).	14
Figura 14. Plántula de judía (<i>P. vulgaris</i>) (Arias Restrepo <i>et al.</i> , 2007).	15
Figura 15. Esquema de los cuatro tipos de hábitos de crecimiento de la judía (<i>P. vulgaris</i>) (Debouck y Hida, 1984).	15
Figura 16. Estadíos iniciales de la plántula de judía (<i>P. vulgaris</i>) (Fernández de C. <i>et al.</i> , 1986).....	16
Figura 17. Esquema del desarrollo de inflorescencia de judía (<i>P. vulgaris</i>) (Debouck y Hida, 1984). ..	16
Figura 18. Componentes de la flor de judía (<i>P. vulgaris</i>) (Debouck y Hida, 1984).....	17
Figura 19. Fruto de la planta de la judía (<i>P. vulgaris</i>) (Debouck y Hida, 1984).	17
Figura 20. Composición interna de la semilla de judía (<i>P. vulgaris</i>) (Debouck y Hida, 1984).	18
Figura 21. Taxonomía de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> (EPPO, 2002).	20
Figura 22. Manchas cloróticas en hoja (González Fernández y Landeras Rodríguez, 2004).....	21
Figura 23. Síntomas en vainas (González Fernández y Landeras Rodríguez, 2004).....	21
Figura 24. Taxonomía del género <i>Trichoderma</i> (EPPO, 1998a).....	24
Figura 25. Fotografía al microscopio de la estructura típica de conidióforos, fiálides y esporas característicos de <i>Trichoderma</i> sp. Elaboración propia.	24
Figura 26. Esquema de la triple interacción <i>Trichoderma</i> -planta-patógeno. Elaboración propia.	26
Figura 27. Taxonomía del género <i>Bacillus</i> (EPPO, 1998b).....	27

Figura 28. Microfotografía al microscopio electrónico de barrido de la morfología de los cristales de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Robaina et al., 2009).	28
Figura 29. Taxonomía del género <i>Pantoea</i> (EPPO, 1998c).	29
Figura 30. Taxonomía del género <i>Pseudomonas</i> (EPPO, 1998d).	30
Figura 31. Asociación a las plantas, rasgos antagonistas y modos de biocontrol de <i>Pseudomonas</i> spp. Elaboración propia a partir de Müller y Behrendt, 2021.	31
Figura 32. <i>T. harzianum</i> T019, <i>T. virens</i> T014 y <i>T. harzianum</i> T059 en placas Petri con medio patata-dextrosa-agar (PDA) tras 7 días en estufa a 25 °C. Elaboración propia.	36
Figura 33. Vasos Erlenmeyer 7 días después de ser inoculado el medio de cultivo patata-dextrosa (PDB) que contienen con esporas de <i>Trichoderma</i> . Elaboración propia.	37
Figura 34. <i>P. koreensis</i> Ps06, <i>B. subtilis</i> Bac02 y <i>P. agglomerans</i> Pan03 en placas Petri con medio King B tras 72 horas en estufa a 25 °C. Elaboración propia.	38
Figura 35. Inoculación de un tratamiento con ayuda de una micropipeta. Elaboración propia.	38
Figura 36. Vainas inmediatamente después de la inoculación. Elaboración propia.	39
Figura 37. Mediciones realizadas sobre halos en vainas de judía tras 5 días. Elaboración propia.	39
Figura 38. Halo I (a) y halo II (b) alrededor de puntos de inoculación en una vaina de judía. Elaboración propia.	41
Figura 39. Daños en las vainas con tratamiento <i>T. virens</i> T032. Daños en toda la vaina (a), daños en control negativo y exudados (b), daños dentro de la vaina (c), micelio dentro de la vaina (d). Elaboración propia.	41
Figura 40. Daños en T2, el control positivo de <i>P. agglomerans</i> Pan03.	42
Figura 41. Diámetro de los halos (mm) alrededor del orificio de inoculación según el microorganismo utilizado. Color azul, bacterias. Color morado, hongo. Color verde para el control positivo con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolica</i> , Ps01. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test Duncan, p<0,05)	43
Figura 42. Diámetro de los halos (mm) alrededor del orificio de inoculación según el tipo de tratamiento utilizado. Color naranja, directo. Color amarillo, metabolitos. Color verde para el control positivo con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolica</i> , Ps01. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test Duncan, p<0,05).	43
Figura 43. Diámetro de los halos (mm) alrededor del orificio de inoculación según el aislamiento utilizado. Color rojo, <i>P. agglomerans</i> Pan03. Color verde, <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolica</i> Ps01 (C+). Color naranja, <i>T. harzianum</i> T059. Color azul, <i>B. subtilis</i> Bac02. Color marrón, <i>T. harzianum</i> T019. Color morado, <i>P. koreensis</i> Ps06. Color rosa, <i>T. virens</i> T014. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test Duncan, p<0,05).	44
44. Diámetro de los halos (mm) alrededor del orificio de inoculación según el aislamiento y el tipo de tratamiento utilizado. Color verde, <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolica</i> Ps01 (C+). Color azul, <i>B. subtilis</i> Bac02. Color rojo, <i>P. agglomerans</i> Pan03. Color morado, <i>P. koreensis</i> Ps06. Color rosa, <i>T. virens</i> T014. Color marrón, <i>T. harzianum</i> T019. Color naranja, <i>T. harzianum</i> T059. Para cada aislamiento, la tonalidad de color más oscura corresponde con el tratamiento directo y la más clara con el de metabolitos. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test Duncan, p<0,05).	45
Figura 45. Vaina del tratamiento directo (con esporas) de <i>T. virens</i> T014 colonizada por micelio. Elaboración propia.	45

Índice de tablas

Tabla 1. Agentes de biocontrol utilizados y sus aplicaciones.....	35
Tabla 2. Aplicaciones en preventivo (Ps01= <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> ; Agente BC = agente de biocontrol).....	36
Tabla 3. Aplicaciones duales (Ps01= <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> ; Agente BC = agente de biocontrol).....	36
Tabla 4. Medias de los diámetros de halos obtenidos junto con error estándar.	42

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Evolución del cultivo de la judía grano (*Phaseolus vulgaris* L.).

1.1.1. *La judía en el mundo*

Judía grano, alubia, haba, frijol, poroto, caraota, korish, quinac, tut, chenec, habilla o chaucha son unos pocos de los muchos nombres comunes que recibe *Phaseolus vulgaris* L., leguminosa de origen prehispánico distribuida desde el siglo XVII por toda América, África, Asia y Europa. La domesticación de esta especie viene dada por dos procesos independientes, uno mesoamericano, en América Central, México y Colombia, y otro andino del sur, en zonas de Perú, Bolivia y el norte de Argentina (FAO, 2018). De aquí en adelante, se utilizará 'judía' para referirse a esta especie, a excepción de la mención de usos concretos populares de otras denominaciones.

Su consumo está extendido mundialmente gracias a sus valores nutricionales, siendo alta en proteína, minerales y fibra, baja en colesterol y aporte calórico. Gracias a esto, en países en desarrollo, la judía seca se trata del principal aporte de proteínas a la dieta, debido a su menor coste que la proteína animal, y su consumo a nivel global se incrementa por sus valores nutritivo y el creciente interés en la dieta mediterránea (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022).

A lo largo de los años, tanto la producción como la superficie cosechada de judía seca en el mundo ha ido aumentando (Figura 1), y se ha visto además un incremento en el rendimiento global de este cultivo (Figura 2).

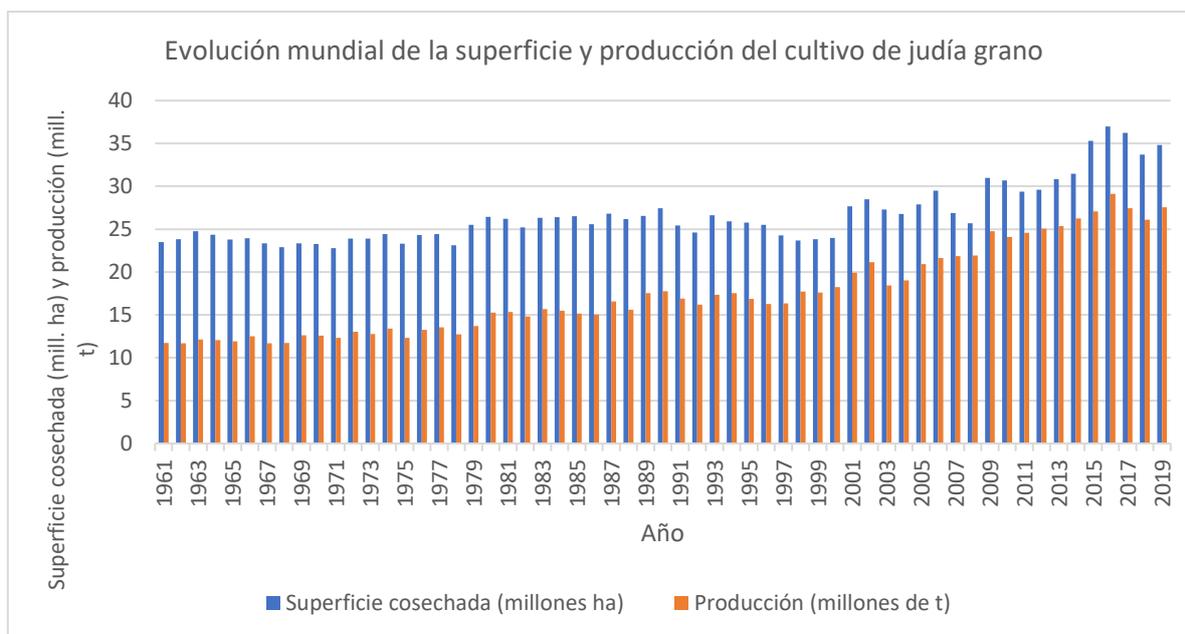


Figura 1. Evolución de la superficie (color azul, en millones de hectáreas), producción (color naranja, en millones de toneladas) del cultivo de la judía grano a nivel mundial desde 1961 hasta la actualidad (FAO, 2022).

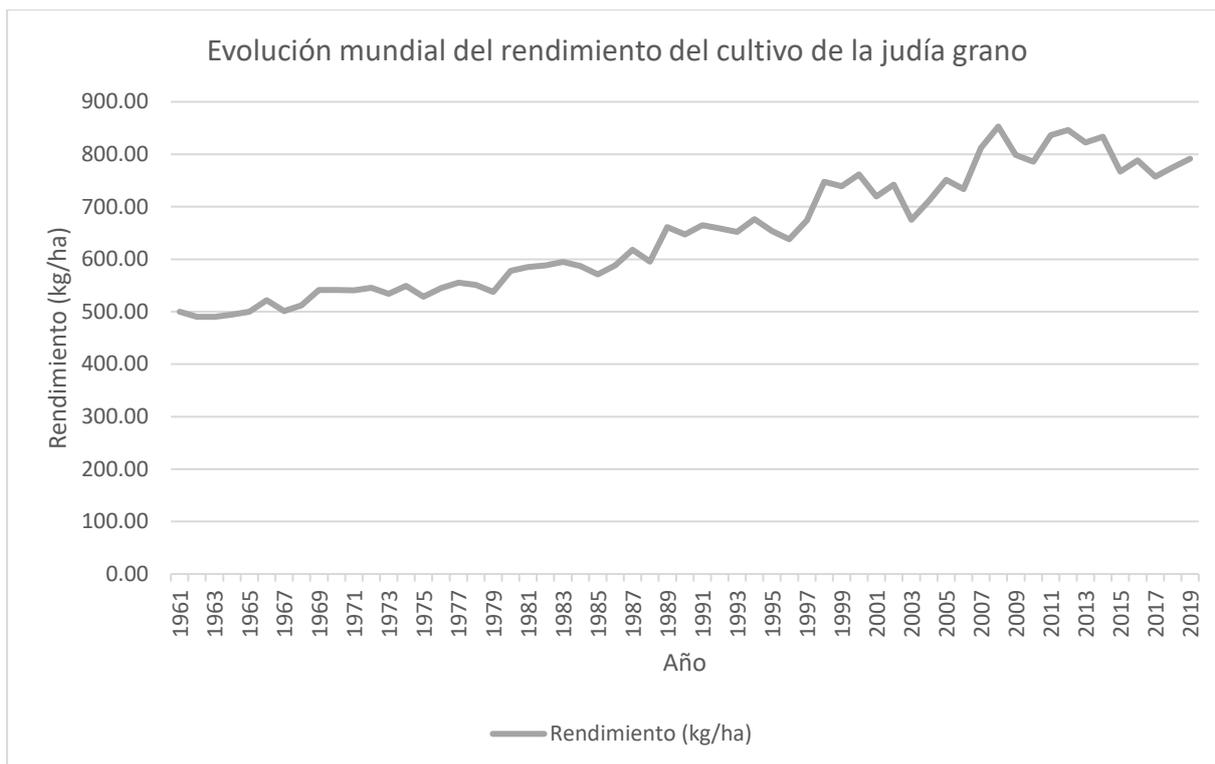


Figura 2. Evolución del rendimiento (kg/ha) del cultivo de la judía grano a nivel mundial desde 1961 hasta la actualidad (FAO, 2022).

Los principales continentes productores a nivel mundial en 2021 fueron Asia, América y África (Figura 3), donde este cultivo es un componente importante de la dieta por razones tradicionales y económicas.

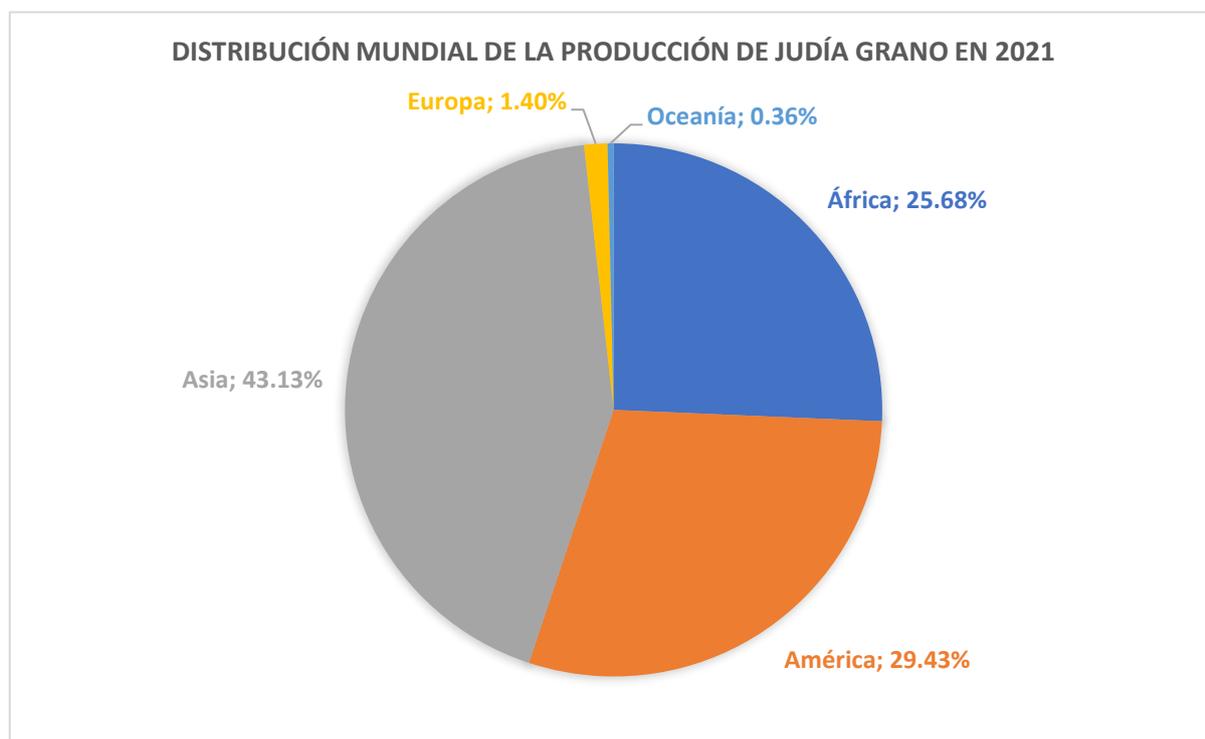


Figura 3. Producción (%) mundial por continentes de judía grano en 2021 (FAO, 2022).

1.1.2. La judía en España

El consumo y la producción de *P. vulgaris* en España desciende de manera constante a lo largo del tiempo. Si bien en 1962 se dedicaban más de 251.600 ha a su producción, en 2017 esta cifra se redujo a 10.310 ha (Figura 4). A pesar de ello, el rendimiento ha aumentado notablemente, pasando de 634 kg/ha en 1961 a 1.908 kg/ha en 2017 (Figura 5).

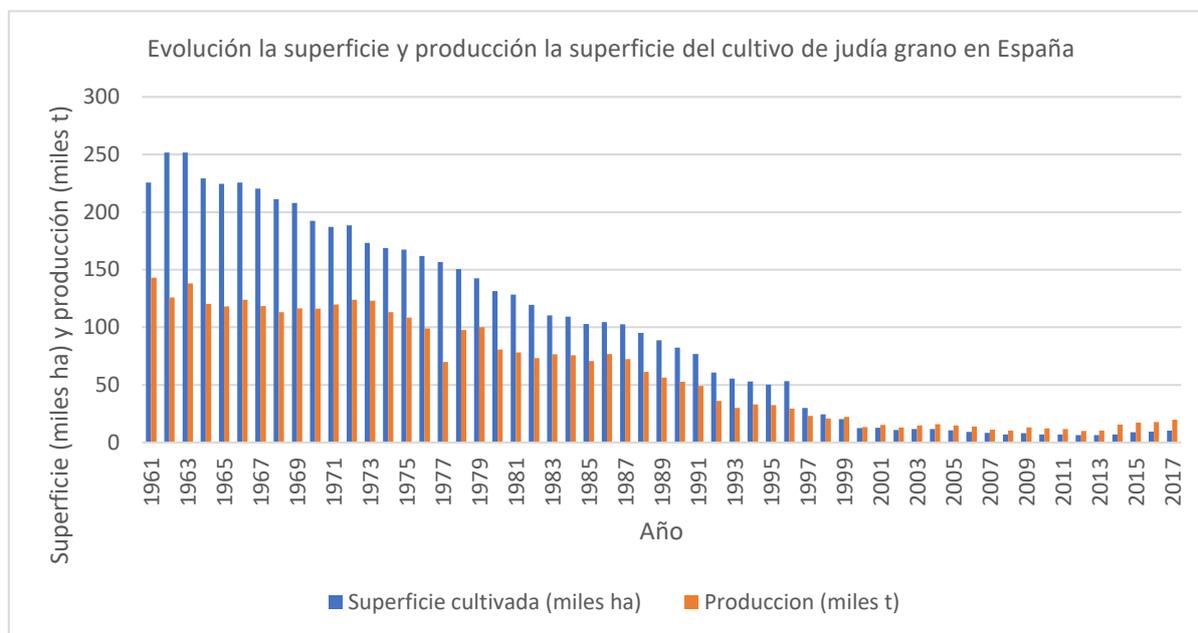


Figura 4. Evolución de la superficie (color azul, miles de hectáreas) y producción (color naranja, miles de toneladas) en España del cultivo de judía grano desde 1961 hasta la actualidad (FAO, 2022).

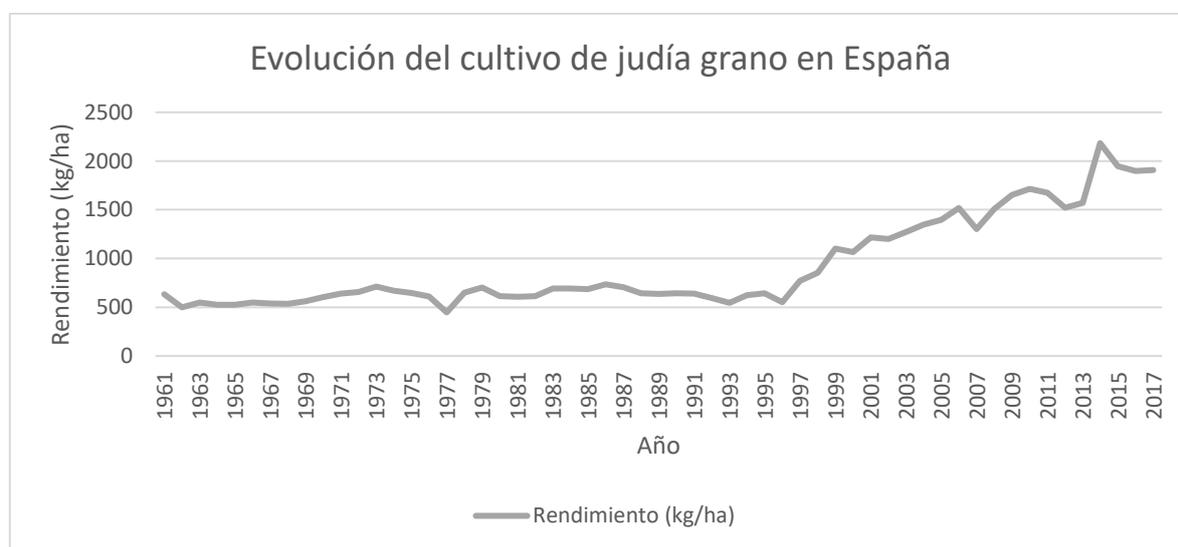


Figura 5. Evolución del rendimiento (kg/ha) en España del cultivo de judía grano desde 1961 hasta la actualidad (FAO, 2022).

A fecha de 2021, las tres principales Comunidades Autónomas españolas en las que se cultiva la judía son Castilla y León, con más de la mitad de la superficie española dedicada al cultivo de judía, seguida de Galicia y el Principado de Asturias (Figura 6). Es en estas comunidades donde se encuentran las cuatro Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.) de

judía en España, que son: I.G.P. “Faba de Lourenzá” (Galicia); I.G.P. “Faba Asturiana”, (Principado de Asturias); I.G.P. “Judías el Barco de Ávila” e I.G.P. “Alubia de La Bañeza – León” (Castilla y León) (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022).

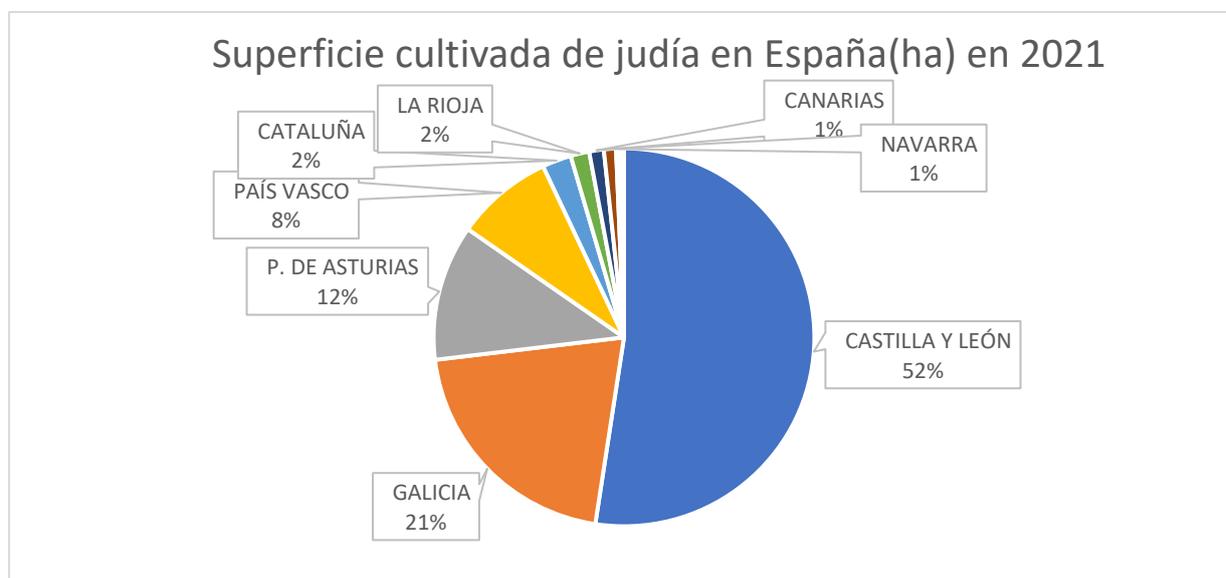


Figura 6. Superficie cultivada (%) de judía en 2021 en España por Comunidades Autónomas (MAPA, 2021).

Si bien en Castilla y León son tres las provincias que cuentan con I.G.P., la propia de Ávila, “Judías el Barco de Ávila”, se limita a tan sólo unas 1.000 ha (Junta de Castilla y León, 1996), mientras que la I.G.P. “Alubia de La Bañeza – León” abarca una extensión geográfica de 5.456 km² situada principalmente en la provincia de León, aunque hay una pequeña superficie en la provincia de Zamora (Junta de Castilla y León, 2005). Por ello, en 2021, el 89% de la superficie dedicada al cultivo de judía seca en la comunidad se encontraba en la provincia de León (Figura 7).

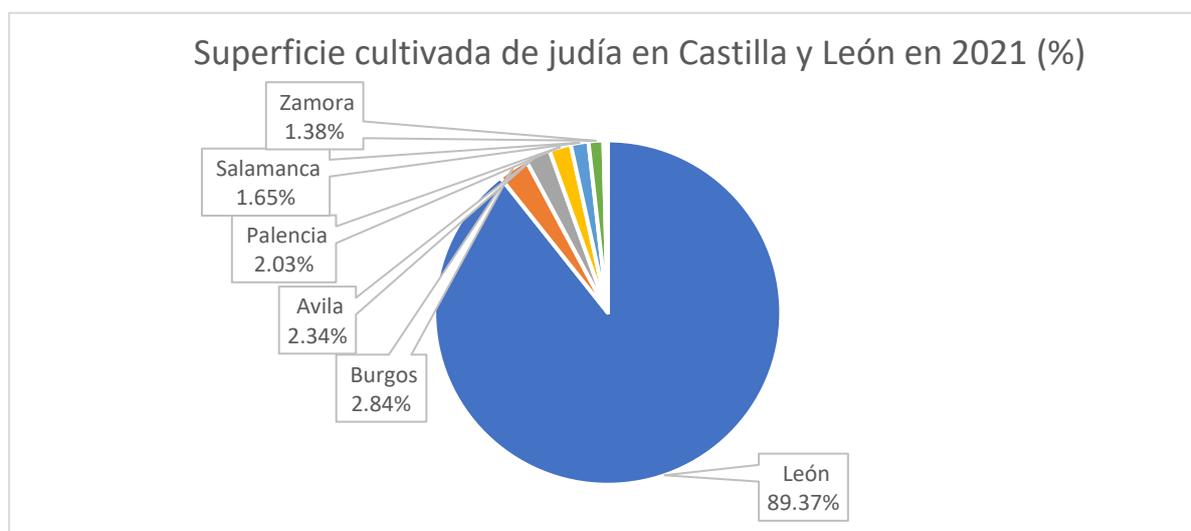


Figura 7. Superficie cultivada (%) de judía en Castilla y León por provincias en 2021 (MAPA, 2021).

1.1.3. La judía en León

El cultivo de la judía en la provincia de León, conocida comúnmente como ‘alubia o haba’, cuenta con una amplia historia y tradición, comenzando el registro del mismo en 1761, cuando se empleaba en rotaciones con el lino en Priaranza y Tabuyo del Monte. En 1928, en estadística recogida por Mourille López, se mencionan las siguientes zonas productoras: Valle del Órbigo, Valdería, El Páramo, Boeza, Valle del Esla, Valle del Cea y Curueño. Destaca el papel de El Páramo en la expansión del cultivo por la provincia, donde la fuerte demanda del producto al comenzar la Primera Guerra Mundial, los precios al alza y la incorporación de este cultivo a las rotaciones, supuso un aumento del nivel de vida de la comarca (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022).

Actualmente, la producción de judía de cuatro variedades distintas está amparada bajo la denominación I.G.P. “Alubia de La Bañeza – León”. Se incluyen en ella municipios de las comarcas de Astorga, El Páramo, Esla-Campos, La Bañeza, La Cabrera, Tierras de León y Benavente y los Valles. Las cuatro variedades aceptadas en esta I.G.P. son ‘canela’, ‘plancheta’, ‘pinta’ y ‘riñón menudo’ (Figura 8) (Junta de Castilla y León, 2005).



Figura 8. Variedades Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) “Alubia de La Bañeza-León”. Elaboración propia a partir de Consejo Regulador de la I.G.P. «Alubia de La Bañeza-León», 2023.

Si bien son sólo cuatro las variedades pertenecientes a la I.G.P., en la provincia se cultivan y consumen muchas otras, como la de la ‘cara de la virgen’, ‘judión de la Granja’, ‘palmeña’, ‘de carne’, ‘negritos’ o ‘jaspeada’ (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022).



Figura 9. Distintas variedades de judías encontradas habitualmente en el mercado. Elaboración propia.

1.2. Taxonomía y descripción botánica de la judía

La judía, *P. vulgaris*, fue descrita por primera vez en 1753 por Linneo, y su taxonomía actual es la reflejada en la Figura 10. El género *Phaseolus*, al que pertenece, cuenta con unas 50 especies, de las cuales son cultivadas otras cuatro: *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray y *P. polyanthus* Greenman (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022).

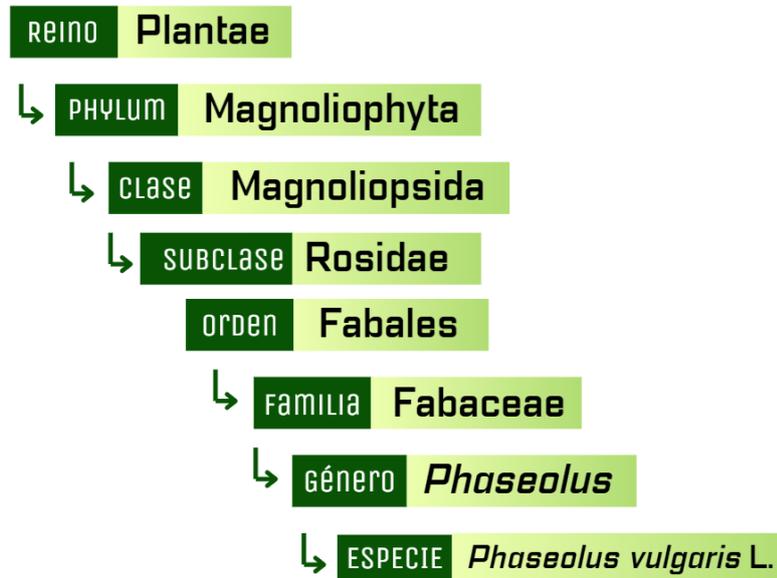


Figura 10. Taxonomía de *Phaseolus vulgaris* (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022).

1.2.1. Raíz

El sistema radicular se origina a partir del meristemo radical, en el extremo distal del embrión, donde se desarrolla la radícula (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022). Ésta será posteriormente la raíz primaria, y a los pocos días tras su emergencia se puede ver en su parte posterior raíces secundarias (Figura 11). Sobre éstas se desarrollarán las raíces terciarias y los pelos secundarios, presentes en todos los puntos de crecimiento de la raíz (Arias Restrepo *et al.*, 2007).

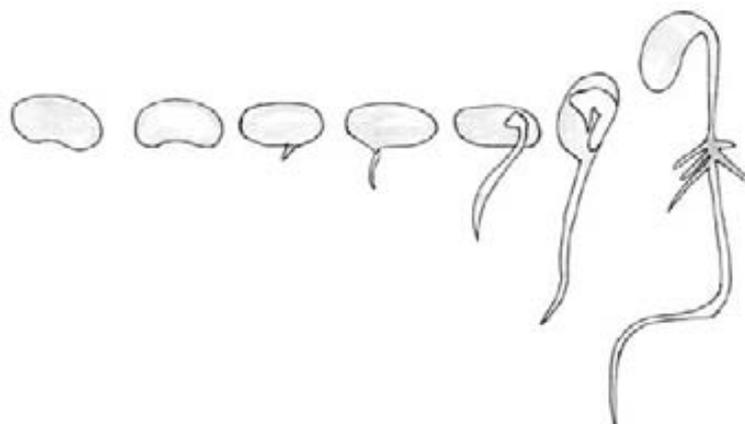


Figura 11. Sistema radicular inicial de *P. vulgaris* (Arias Restrepo *et al.*, 2007).

Tiene un sistema radicular (Figura 12) que tiende a ser fasciculado y superficial, ya que el mayor volumen de raíz se halla en los primeros 20 cm de profundidad (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022).



Figura 12. Raíz completamente desarrollada de una planta de judía (*P. vulgaris*) (Arias Restrepo *et al.*, 2007).

A dicha raíz se encuentran asociados en forma de nódulos bacterias del género *Rhizobium*, capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022).

1.2.2. Tallo

El tallo se origina desde el meristemo apical de la semilla, y está compuesto por una sucesión de nudos (punto de inserción de hojas o cotiledones) (Figura 13), con una sección angular y coloración verde, rosada o morada (Arias Restrepo *et al.*, 2007; FAO, 2018).



Figura 13. Tallo de planta de judía (*P. vulgaris*)(Arias Restrepo *et al.*, 2007).

El tallo comienza en la inserción de las raíces, y, dependiendo de los siguientes nudos, se distinguen varias partes (Figura 14): entre la inserción y el primer nudo de los cotiledones, el hipocótilo; entre el nudo de los cotiledones y el primero de las hojas, el epicótilo (Arias Restrepo *et al.*, 2007). En cada uno de los siguientes nudos se encuentra el complejo axilar o tríada, donde se diferencian las partes vegetativas o inflorescencias (FAO, 2018).

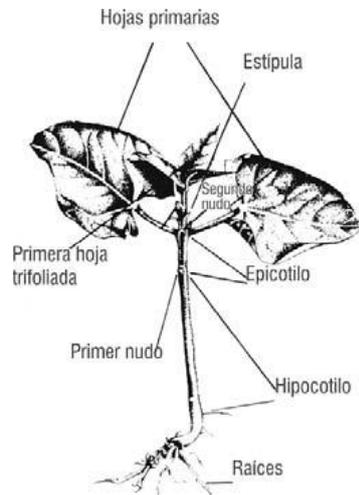


Figura 14. Plántula de judía (*P. vulgaris*) (Arias Restrepo *et al.*, 2007).

Dependiendo del tipo de desarrollo de la parte terminal del tallo, el número de nudos, la longitud de los entrenudos y, en consecuencia, la altura de la planta, la aptitud para trepar y el grado y tipo de ramificación, se distinguen cuatro hábitos de crecimiento (Figura 15) (Arias Restrepo *et al.*, 2007):

- Tipo I: hábito de crecimiento determinado arbustivo.
- Tipo II: hábito de crecimiento indeterminado arbustivo.
- Tipo III: hábito de crecimiento indeterminado postrado.
- Tipo IV: hábito de crecimiento indeterminado trepador.

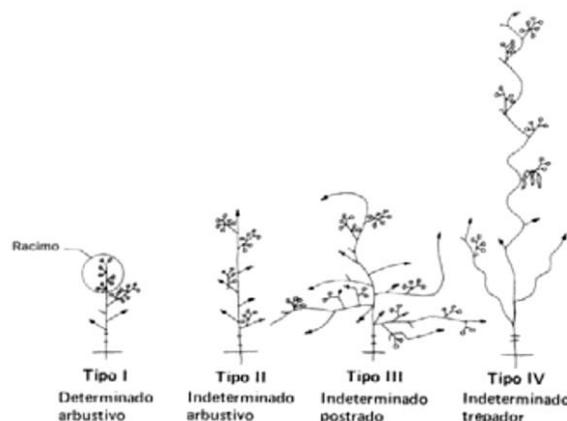


Figura 15. Esquema de los cuatro tipos de hábitos de crecimiento de la judía (*P. vulgaris*) (Debouck y Hida, 1984).

1.2.3. Hojas

Se distinguen tres tipos de hoja (Figura 16): las cotiledonares, que actúan como órgano de reserva en las primeras fases y son simples, opuestas y carnosas; las secundarias, presentes en el segundo nudo y simples y opuestas; y las definitivas o nomófilos, que son compuestas, alternas y trifoliadas (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022).

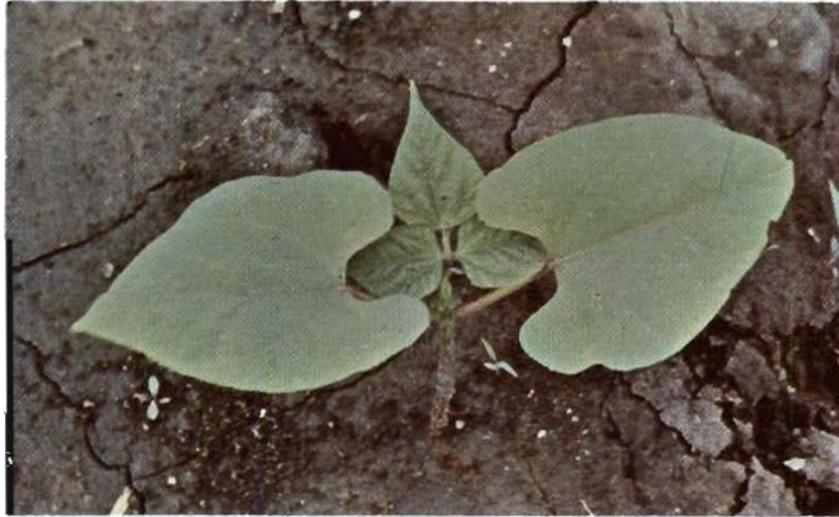


Figura 16. Estadíos iniciales de la plántula de judía (*P. vulgaris*) (Fernández de C. *et al.*, 1986).

1.2.4. Inflorescencia

La inflorescencia de la judía es un racimo de racimos (Figura 17), compuesto por tres elementos: el eje de la inflorescencia compuesto de pedúnculo y de raquis, las brácteas primarias y los botones florales (Debouck y Hida, 1984). Puede encontrarse en posición axilar o terminal y cada una porta varias flores, no más de seis (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022)..

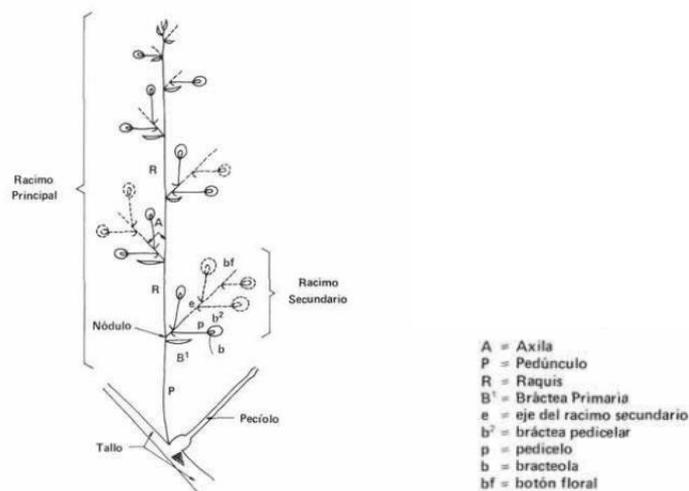


Figura 17. Esquema del desarrollo de inflorescencia de judía (*P. vulgaris*) (Debouck y Hida, 1984).

La flor de la judía es papilionácea, con simetría bilateral y se distinguen en ella las siguientes partes: pedicelo glabro o subglabro con pelos uncinulados y en su base una bráctea pedicelar; cáliz gamosépalo, campanulado, con cinco dientes triangulares dispuestos como labios en dos grupos; y una corola pentámera papilionácea, con dos pétalos soldados por su base y tres libres. En ella está el estandarte, dos alas, la quilla, el androceo y el gineceo (Figura 18). Su disposición favorece la autopolinización (Debouck y Hida, 1984).

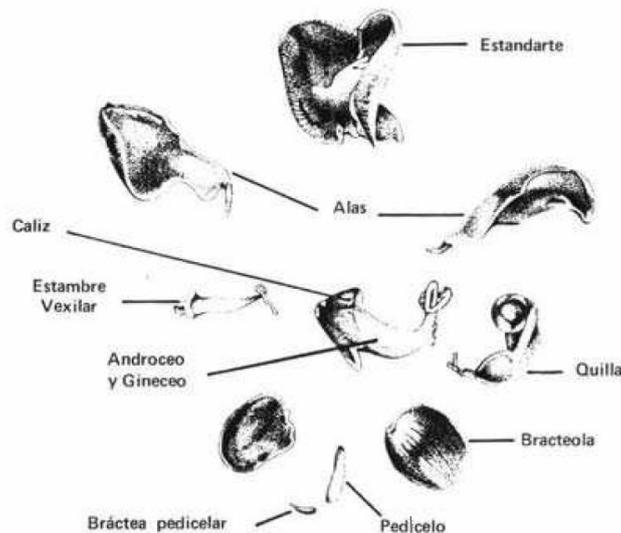


Figura 18. Componentes de la flor de judía (*P. vulgaris*) (Debouck y Hida, 1984).

1.2.5. Fruto

El fruto se trata de una vaina con dos valvas provenientes del ovario comprimido. En su unión aparecen dos suturas: la dorsal o placentar y la ventral (Figura 19). En ellas, los óvulos y, por tanto, las futuras semillas, alternan (Debouck y Hida, 1984). Dependiendo de la variedad, cambia la dehiscencia, forma, color, sección, tamaño y textura, así como la posición y longitud del pico de la vaina, útil para la distinción varietal (Reinoso Sánchez *et al.*, 2022)..

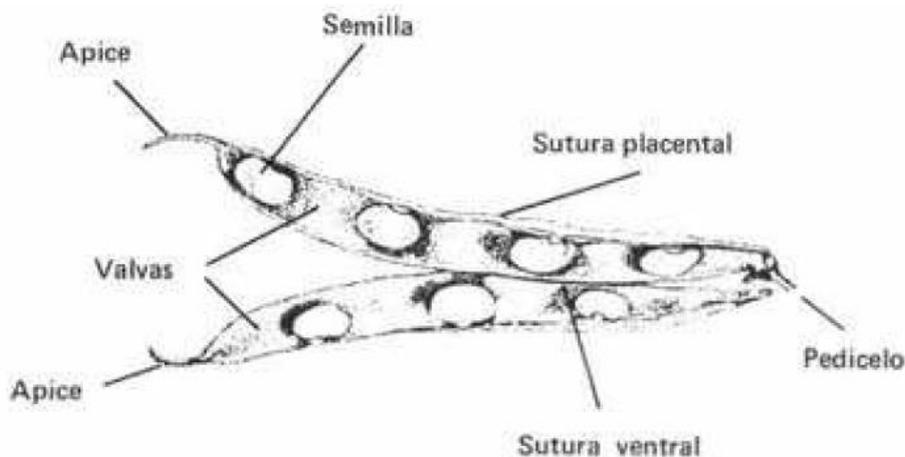


Figura 19. Fruto de la planta de la judía (*P. vulgaris*) (Debouck y Hida, 1984).

1.2.6. Semillas

La semilla de judía no posee albumen, por lo que sus reservas se concentran en los cotiledones. Se origina de un óvulo compilótropo y puede tener diversas formas, entre ellas de riñón, cilíndrica o esférica (Debouck y Hida, 1984). Sus partes principales externas son la testa, el hílum, el micrópilo y el rafe; y sus partes internas dos cotiledones, la plúmula, la radícula, las dos hojas primarias, el hipocótilo y el epicótilo (Figura 20) (Debouck y Hida, 1984).

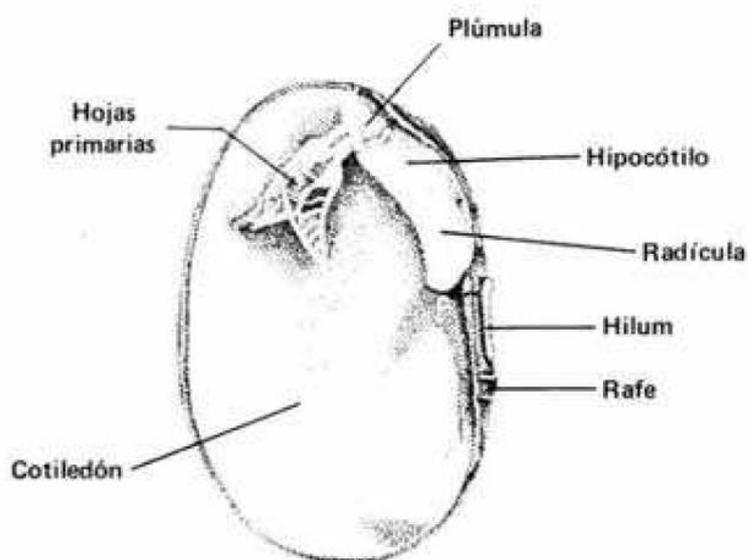


Figura 20. Composición interna de la semilla de judía (*P. vulgaris*) (Debouck y Hida, 1984).

1.3. Manejo agronómico de la judía

1.3.1. Suelos

El cultivo de *P. vulgaris* requiere suelos profundos, de entre 35 y 40 cm de profundidad, sueltos y porosos que permitan el drenaje y la aireación, preferentemente de textura franco-limosa, pero tolerando franco-arcillosa (Arias Restrepo *et al.*, 2007; FAO, 2018). El pH puede variar entre 5,5 y 7,5, siendo muy susceptible el cultivo a valores extremos de acidez, especialmente en presencia de altos niveles de aluminio y manganeso, así como a la salinidad (FAO, 2018). Se puede adaptar a suelos con topografía tanto plana como ondulada, y cultivarse desde los 200 m hasta los 2900 m de altitud (Arias Restrepo *et al.*, 2007; FAO, 2018).

1.3.2. Clima

Al tratarse de una especie proveniente de climas subtropicales, se adapta mejor a las condiciones de valle y subtropicales, siendo la temperatura ideal para su desarrollo entre 14 y 18 °C, aunque se pueden producir en climas más fríos o cálidos. Por lo general, los climas fríos retrasan el crecimiento y los cálidos lo adelantan. Para su desarrollo óptimo necesita

valores de 8-10°C para la germinación, 15°C para la floración y 18-20°C para la madurez, aunque pueden soportar temperaturas más extremas durante cortos periodos. En cuanto a la precipitación, las necesidades totales de agua para todo el ciclo del cultivo son entre 350 y 600 mm (FAO, 2018).

1.3.3. Siembra

Dependiendo de la topografía del lugar, se realiza una labranza u otra, habitualmente mecanizada con tractor (FAO, 2018). En la zona de León se suele realizar una labor profunda previa a la siembra y la aportación de un abono mineral del tipo 8-15-15. La siembra se lleva a cabo con sembradora monograno dejando una separación entre líneas de 50 a 60 cm, y manteniendo una separación entre semillas dentro de la línea de 15 a 18 cm (Fidalgo *et al.*, 1993).

1.3.4. Cuidado del cultivo

El sistema de cultivo de la judía predominante es el monocultivo, aunque en ocasiones se utilicen diversas asociaciones con el maíz en zonas como Guatemala, El Salvador, Bolivia y, dentro de España, en Galicia (Casquero *et al.*, 1994; FAO, 2018).

Debido a la baja capacidad para competir con malezas, se recomienda la eliminación de éstas en las primeras fases del cultivo, normalmente unos 30 días después de la siembra (Fidalgo *et al.*, 1993; FAO, 2018). Además, se recomienda riegos frecuentes que eviten mojar el tallo de las plantas y el control de los posibles problemas fitosanitarios (Fidalgo *et al.*, 1993).

Las principales plagas y enfermedades a las que se enfrenta el cultivo de judías en la provincia de León son araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), pulgones (*Aphis fabae* Scopoli; *Myzus persicae* Sulzer), lepidópteros (*Autographa gamma* L., *Chrysodeixis chalcites* Esper, *Helicoverpa armigera* Hübner), roya (*Uromyces* spp.), podredumbre blanca (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib.), podredumbre gris (*Botrytis cinerea* Pers.), enfermedades del cuello (*Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Pythium* spp.), virus del mosaico común de la judía (Bean common mosaic virus, BCMV) y grasa de la judía (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Burk.) (Reinoso Sánchez y Valenciano Montenegro, 1998; Ministerio de Agricultura, 2021), enfermedad que se detallará más adelante.

1.3.5. Cosecha

Para la recolección de este cultivo hay que considerar varios factores fundamentales que influyen en este proceso, como son la heterogeneidad de la maduración, el porte de las plantas, la lignificación del tallo, la masa vegetal del cultivo, la dehiscencia de los frutos, la sensibilidad de las semillas al manejo y la conservación del grano (Antonio Boto Fidalgo *et al.*, 1995). Si bien todavía se realiza en ciertas zonas el arranque manual (Antonio Boto Fidalgo

et al., 1995; FAO, 2018), el proceso suele ser mecanizado en dos fases: el arranque o siega y, pasados de 8 a 15 días para el secado de las plantas, el trillado y separación de grano y paja. La primera fase se realiza durante las primeras horas del día, con rocío, para evitar problemas generados por la dehiscencia, mientras que la segunda, por la razón opuesta, es preferible realizarla por la tarde con tiempo seco y caluroso (Antonio Boto Fidalgo *et al.*, 1995).

En cuanto al momento de la recolección, por su heterogeneidad en la maduración, se recomienda realizar cuando estén secas entre el 60 y el 80 % de las vainas y el resto hayan cambiado al color propio de su variedad (Fidalgo *et al.*, 1993).

1.4. La grasa de la judía (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*)

1.4.1. Taxonomía y morfología

El patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* (Burk.) Young et al., (sinónimos *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Pseudomonas phaseolicola* (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010)) conocido comúnmente como “grasa de la judía” o “halo blight” en inglés, se trata de una bacteria perteneciente a la familia Pseudomonaceae (Figura 21) que afecta a la judía común, *P. vulgaris*.

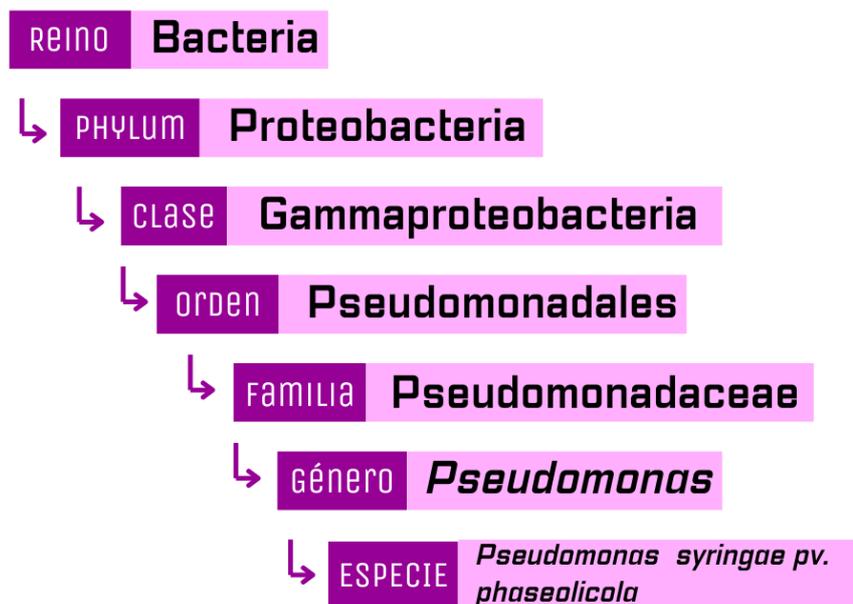


Figura 21. Taxonomía de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (EPPO, 2002).

Se trata de una bacteria Gram-negativa, aeróbica, móvil, con forma de bacilo, longitud de 1,5 mm, entre 0,7 y 1,2 mm de diámetro, cuenta con al menos un flagelo y sus temperaturas óptimas de crecimiento son entre 25 y 30°C (Arnold *et al.*, 2011).

Dentro de este patovar, se distinguen nueve razas en función de sus interacciones con ocho cultivares de judía y cinco pares de genes *avr* y *R*, de las cuales cinco están distribuidas mundialmente (1, 2, 5, 6 y 7), con predominancia de la raza 6 (Arnold *et al.*, 2011).

1.4.2. Síntomas y daños en judía

La sintomatología se aprecia en las hojas donde aparecen pequeñas lesiones con halo clorótico (Figura 22), y en vainas manchas con aspecto graso, de ahí su nombre común, que evoluciona a manchas marrones, en ocasiones con exudados (Figura 23) (González Fernández y Landeras Rodríguez, 2004). La aparición de estos síntomas está condicionada por la temperatura y la producción de faseolotoxina (Rico *et al.*, 2003). Existen cepas bacterianas virulentas en vaina, pero no en hojas, que son aquellas no productoras de faseolotoxinas (Rico *et al.*, 2003). Se describen, además, daños en tallos y peciolo, y las semillas pueden o no presentar síntomas. En caso afirmativo, tienen manchas irregulares amarillas o arrugas, y la infección por semillas se puede reconocer por clorosis general y crecimiento bajo o anormal (Arnold *et al.*, 2011).



Figura 22. Manchas cloróticas en hoja (González Fernández y Landeras Rodríguez, 2004).



Figura 23. Síntomas en vainas (González Fernández y Landeras Rodríguez, 2004).

En cuanto a los daños económicos, existe poca información, pero se estiman pérdidas de producción de hasta el 60 % en determinadas circunstancias, pudiendo ser considerada una de las enfermedades más importantes en el cultivo de judía en Europa (Murillo *et al.*, 2010).

1.4.3. Control en judía

El control de esta enfermedad es difícil. La mayoría de las fuentes recomiendan especialmente el uso de medidas culturales como emplear semilla certificada sana (González Fernández y Fernández Sanz, 2010; Murillo *et al.*, 2010), producida en zonas áridas y con riego a pie (Murillo *et al.*, 2010), recoger restos de cosecha para destruirlos fuera de la parcela, rotar cultivos, mantener limpieza de maquinaria y aperos (González Fernández y Fernández Sanz, 2010) y eliminar las plantas adventicias de la parcela, ya que pueden actuar como reservorio (González Fernández y Fernández Sanz, 2010; Fernández-Sanz *et al.*, 2016). Se aconseja adicionalmente el uso de cultivares resistentes o tolerantes (Murillo *et al.*, 2010; Arnold *et al.*, 2011).

En cuanto a métodos químicos, se proponía el uso de cobre y de estreptomicina (Murillo *et al.*, 2010; Arnold *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017), pero se ha demostrado resistencia al cobre en la mayoría de las cepas estudiadas (Zhang *et al.*, 2017). Ya desde hace más de 60 años se constató la preferencia por medidas culturales, debido a la baja eficacia de los bactericidas en semilla (Romero, 1962).

Cabe mencionar que, actualmente, en el Registro de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (<https://servicio.mapa.gob.es/regfiweb>) no figura ningún producto vigente para tratar esta enfermedad en judía, buscando bajo las denominaciones siguientes, con todas las combinaciones posibles cultivo – enfermedad:

Cultivo: JUDÍA FORRAJERA, JUDÍA PARA GRANO, JUDÍA VERDE, JUDÍAS VERDES

Enfermedad: PSEUDOMONAS (DENOMINACIÓN EN REVISIÓN), PSEUDOMONAS SPP., PSEUDOMONAS SYRINGAE, BACTERIOSIS.

Es evidente, por lo tanto, que urge el desarrollo de nuevos métodos de control para esta enfermedad, como pueden ser los biológicos.

1.5. Agentes de biocontrol

1.5.1. Antecedentes y relevancia

Históricamente, el control de plagas ha sido necesario para una producción más eficiente y sencilla de alimento, existiendo antecedentes como los métodos para quitar insectos en el Antiguo Egipto con el papiro Eber, la medicina tradicional China o la Odisea de Homero, además del uso de ‘para-plaguicidas’ como mercurio y arsénico entorno al siglo XVI (Abubakar *et al.*, 2019).

El momento decisivo para la historia de los productos fitosanitarios se dio en 1939, gracias a la invención del dicloro-difenil-tricloroetano o DDT (Abubakar *et al.*, 2019), un organoclorado de alta persistencia (Yagüe Martínez de Tejada, 2008).

Su uso en la agricultura estadounidense comenzó a causar preocupación, especialmente tras la publicación de “Silent Spring”, en el que su autora describía los efectos nocivos de éste y otros plaguicidas sobre diversos elementos del ecosistema (Carson, 1962; Abubakar *et al.*, 2019). A raíz de esto, comenzaron las prohibiciones del DDT, produciéndose en España en el año 1976 (Yagüe Martínez de Tejada, 2008).

Desde entonces, la tendencia tanto en España como en Europa es reducir el uso de plaguicidas de síntesis química, con iniciativa como “Farm to Fork”, de la Comisión Europea, que tiene como objetivos la reducción del 50 % de plaguicidas químicos y con riesgo para 2030 (Comisión Europea, 2023), o campañas informativas abogando por la reducción de su uso en España (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, sin fecha). No hay que olvidar las restricciones legales, debido a las cuales se reducen el número de materias primas autorizadas y productos comerciales en el registro del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2023b).

En este contexto, junto con la necesidad de seguir alimentando a una población global creciente, se plantea una solución: el uso de “bioplaguicidas” o agentes de control biológico (biological control agents, BCAs) para proteger los cultivos (Antoszewski *et al.*, 2022).

La utilización de BCAs conlleva varios beneficios, entre ellos: control de plagas manteniendo el microbioma del suelo diverso, promoción del crecimiento de las plantas en ciertas ocasiones, amplias posibilidades para el uso de compuestos volátiles producidos por estos microorganismos, innovación en cultivos sin suelo y otros (Bakker *et al.*, 2020; Antoszewski *et al.*, 2022; Almeida *et al.*, 2023; Mourouzidou *et al.*, 2023).

Por lo tanto, se describen a continuación varios géneros de microorganismos utilizados ampliamente como BCAs, y sus posibles aplicaciones para la lucha frente a *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

1.5.2. *Trichoderma*

Entre los hongos ascomicetes y filamentos se encuentra el género *Trichoderma* Persoon (Druzhinina *et al.*, 2011) que cuenta con 375 especies a fecha de junio de 2020 (Cai y Druzhinina, 2021).

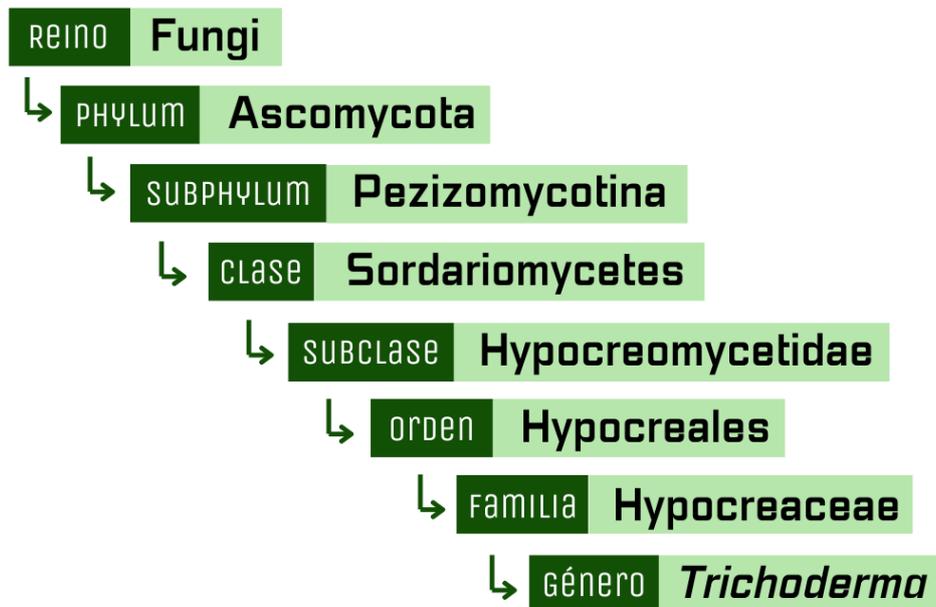


Figura 24. Taxonomía del género *Trichoderma* (EPPO, 1998a).

Los hongos de este género (Figura 24) se describen como ubicuos, micotróficos y saprotrofos. Cuentan con un gran potencial oportunista, encontrándose en suelo, madera, otros hongos y múltiples sustratos (Druzhinina *et al.*, 2011). Son, además, simbiontes no virulentos en las plantas, a las cuales protegen actuando como parásitos y antagonistas de muchos hongos fitopatógenos (Vinale *et al.*, 2008).



Figura 25. Fotografía al microscopio de la estructura típica de conidióforos, fiálides y esporas característicos de *Trichoderma* sp. Elaboración propia.

La asociación y efecto sobre la planta es descrita por Vinale *et al.* (2008) como la triple interacción *Trichoderma* - planta - patógeno, que se desglosa en las interacciones de sus componentes entre sí de la siguiente manera:

Interacción *Trichoderma* – patógeno: el género *Trichoderma* es un invasor secundario oportunista de rápido crecimiento, gran productor de esporas, enzimas y antibióticos. Por ello, su relación con el patógeno se puede producir de varias maneras. En primer lugar, el micoparasitismo gracias a las enzimas líticas, en el cual reconoce al patógeno, lo ataca y penetra hasta su consecuente muerte. En segundo lugar, la antibiosis y producción de metabolitos secundarios, que incluye un grupo heterogéneo de compuestos naturales diferentes a nivel químico. Esta característica depende de la cepa, e incluye sustancias antifúngicas de diversos tipos, clasificadas como antibióticos volátiles, compuestos solubles en agua y peptaiboles (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991). Por último, competición con patógenos por elementos necesarios para el crecimiento como carbono y nitrógeno, ya que tiene una gran capacidad para movilizar y conseguir nutrientes del suelo de manera más efectiva que muchos otros microorganismos presentes en la rizosfera.

Interacción *Trichoderma* – planta: algunas especies de *Trichoderma* son capaces de colonizar la rizosfera y provocar cambios en el metabolismo de la planta. La colonización de las raíces se limita a las primeras capas de células y la capa exterior, formando una interacción simbiótica en vez de parasitaria. Esta asociación promueve el crecimiento y la productividad de la planta en el caso de lechuga, tomate, pimiento, judía y otros cultivos. Igualmente, es capaz de inducir las respuestas de defensa de la planta frente a ataques patógenos si la planta es tratada previamente con *Trichoderma*, ya que se activan los mecanismos de resistencia sistémica inducida ('induced systemic resistance', ISR) o de resistencia adquirida localizada inducida, también llamada resistencia sistémica adquirida (Mayo *et al.*, 2015, 2016; Mayo-Prieto *et al.*, 2020; Morán-Diez *et al.*, 2021; Cardoza *et al.*, 2022) ('induced localized acquired resistance', LAR o 'systemic acquired resistance', SAR).

Estas interacciones, junto con el efecto del patógeno sobre la planta, forma la denominada triple **interacción *Trichoderma* - planta - patógeno**, poco estudiada por su complejidad y la dificultad que plantea *in vitro*, pero que se asemeja más a la interacción que se da en campo (Vinale *et al.*, 2008). La interacción depende de cada uno de los tres componentes involucrados, dado que tanto factores relacionados con la enfermedad regulan esta triple interacción, así como la presencia de un antagonista modifica cuantitativa y cualitativamente la respuesta de la planta (Marra *et al.*, 2006).

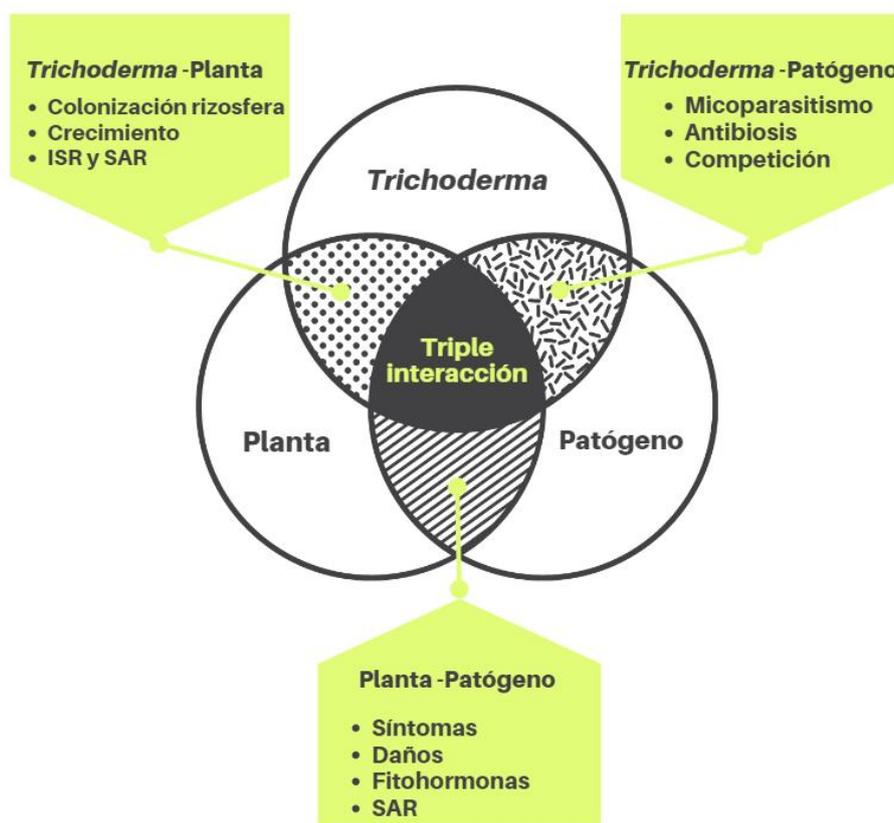


Figura 26. Esquema de la triple interacción *Trichoderma*-planta-patógeno. Elaboración propia.

En algunos casos *Trichoderma* spp. pueden actuar como parásitos, por ejemplo, contra nematodos presentes en la rizosfera (Druzhinina *et al.*, 2011), cerambícidos que afectan a la madera de la vid (Rodríguez-González *et al.*, 2016; A. Rodríguez-González *et al.*, 2018), gorgojos de la judía (Rodríguez-González *et al.*, 2016; Á. Rodríguez-González *et al.*, 2018) e incluso causando complicaciones a humanos inmunodeprimidos (Hatvani *et al.*, 2019; Kredics *et al.*, 2021).

Por estas razones, diversas cepas de *Trichoderma* se han convertido en parte importante del control integrado de plagas, siendo un enfoque importante para investigación y desarrollo de nuevas alternativas a los plaguicidas químicos (Kredics *et al.*, 2021).

En cuanto al control de *P. syringae*, diversas especies y cepas de *Trichoderma* han sido efectivas para su control y reducción de los daños causados.

Trichoderma asperellum (T34) ha inducido una reducción de los daños en hoja de tomate causados por *P. syringae* pv. *tomato* al ser aplicado al sustrato, restaurando las cualidades de un suelo supresivo o confiriéndoselas a uno conductivo (Segarra *et al.*, 2013).

La inoculación de *Trichoderma* comercial ('TriMix') en raíces establece una comunidad endofítica de raíz en kiwi, que se mantiene y ayuda a la planta a reducir los síntomas de *P. syringae* pv. *actinidiae* (Hill *et al.*, 2015).

El tratamiento preventivo de las raíces de pepinos con *T. asperellum* inhibe la proliferación de *P. syringae* pv. *lachrymans* en hojas, debido a la acumulación de transcritos de genes asociados a la defensa biosintética y de compuestos fenólicos con actividad antibiótica (Yedidia *et al.*, 2003).

Una mezcla comercial de tres cepas de *Trichoderma* (3 Tac-I/Beta) ha sido efectiva contra *P. syringae* pv. *syringae*, tanto *in vivo* como *in vitro*. En el primer caso, ha reducido la superficie de chancros en cerezo, mientras que en el segundo se han observado daños en las membranas celulares del patógeno, asociados con péptidos antibióticos (Moya-Elizondo *et al.*, 2019).

1.5.3. *Bacillus*

En la clase de bacterias Firmicutes o Bacillota, se encuentra el género de bacterias Gram-positivas denominado *Bacillus* (Figura 27), caracterizado por su capacidad para producir esporas (Nowocień y Sokołowska, 2022), además de múltiples compuestos como enzimas extracelulares, metabolitos secundarios y bacteriocinas (proteínas o péptidos ribosomales), de gran interés para diversas industrias o control biológico (Sansinenea, 2019).

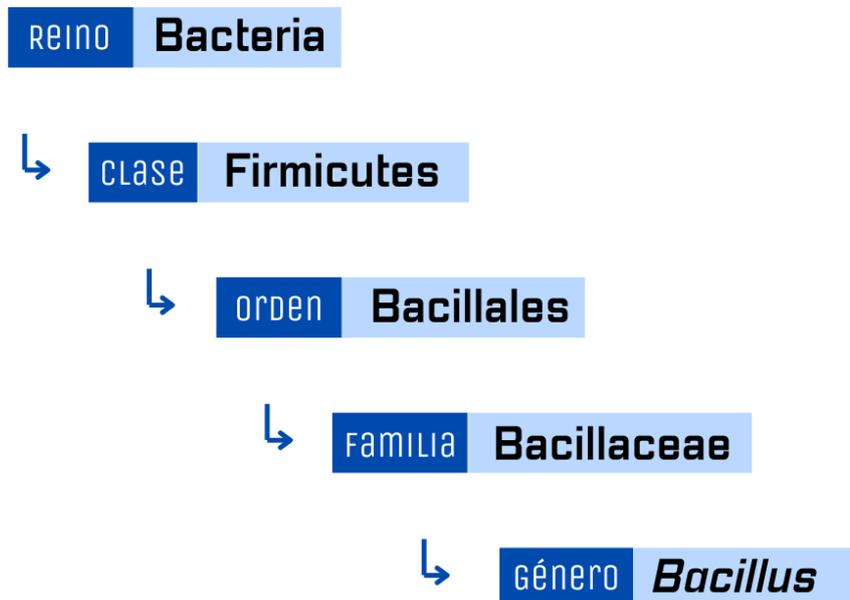


Figura 27. Taxonomía del género *Bacillus* (EPP0, 1998b).

Muchas bacterias de este género tienen capacidad para colonizar las raíces de forma beneficiosa tanto para la bacteria como para la planta hospedadora. Gracias a estas asociaciones positivas, se consideran rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, o 'plant-growth-promoting rhizobacteria' (PGPR) (Hashem *et al.*, 2019).

La actividad de control biológico característica de *Bacillus* sp. puede deberse a varias causas como: mecanismo de acción de agentes de control microbianos, inducción de

resistencia del hospedador y crecimiento de la planta, interacciones sinérgicas con bacterias de nódulos radiculares e inducción de un agente sistémico en las raíces (Hashem *et al.*, 2019).

Además de su capacidad para promocionar el crecimiento de la planta y desencadenar las respuestas ISR y SAR, (Sansinenea, 2019) beneficiosas para el control del estrés biótico, cabe destacar los diversos mecanismos por los que actúan como BCA. Éstos son variados, como proteínas proteolíticas y amiolíticas, que degradan componentes de la pared celular fúngica; bacteriocinas, que actúan como agentes bactericidas o bacterioestáticos contra un limitado número de especies; antibióticos, capaces de reducir el crecimiento de bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, y de hongos; y, finalmente, la síntesis de las toxinas cristalinas de proteínas Cry y Cyt (Figura 28) característica de *Bacillus thuringiensis* y efectiva frente a insectos (Nowocień y Sokołowska, 2022).

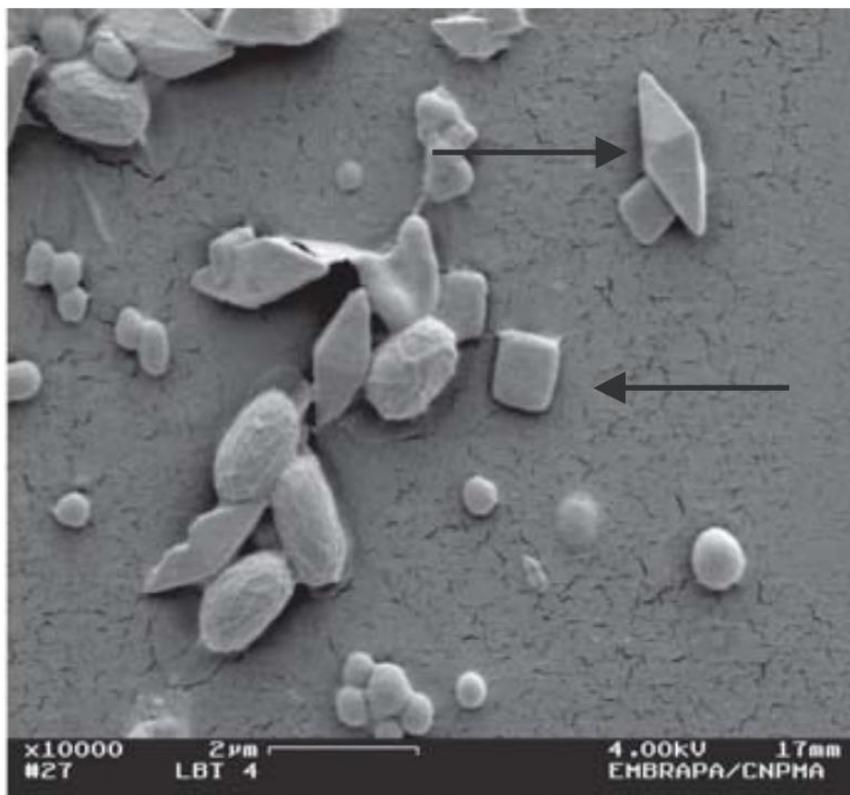


Figura 28. Microfotografía al microscopio electrónico de barrido de la morfología de los cristales de las cepas de *Bacillus thuringiensis* (Robaina *et al.*, 2009).

Distintas especies del género *Bacillus* son utilizadas en diferentes cultivos, como peral, arroz, patata, tomate, mostaza, berenjena, maíz o pimiento frente a patógenos muy diversos, como *Aspergillus westerdijkiae* Frisvad & Samson, *Fusarium oxysporum* Schldl, *Pythium ultimum* Trow, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *Phytophthora capsici* Leonian o *Fusarium graminearum* Schwein (Khan *et al.*, 2022).

La efectividad de este género de PGPR frente al patógeno *P. syringae* se ha probado en diversos ensayos con varias especies de plantas, demostrando su efectividad en la

reducción de las manchas en hoja en tomate causada por *P. syringae* usando *B. subtilis* (Yang *et al.*, 2021), así como en remolacha utilizando *B. amyloliquefaciens* frente a *P. syringae* pv. *aptata* (Nikolić *et al.*, 2019). De igual manera, bacterias del género *Bacillus* han reducido la necrosis del tallo en cítricos causada por *P. syringae* pv. *syringae* (Mougou y Boughalleb-M'hamdi, 2018). En el caso del chancro bacteriano del kiwi, causado por *P. syringae* pv. *actinidiae*, el bioplaguicida Amylo-X, basado en *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, ha demostrado su eficacia en la reducción de la enfermedad, así como su persistencia en hojas (Biondi *et al.*, 2021). Por último, cepas de *B. alcalophilus*, *B. atrophaeus*, *B. megaterium*, *B. mycoides* y *B. subtilis* han demostrado su efectividad creando halos de inhibición *in vitro* y reduciendo el desarrollo de *P. syringae* pv. *phaseolica* *in vivo* (Dönmez y Aliyeva, 2022).

1.5.4. *Pantoea*

El género *Pantoea* agrupa bacterias Gram-negativas en Enterobacteriaceae (Figura 29), que pueden encontrarse en diversos ambientes como suelo, agua y plantas (Yang *et al.*, 2023). Asimismo, se han identificado especies de este género asociadas a insectos y humanos, si bien las primeras bacterias aisladas fueron identificadas como fitopatógenos en multitud de cultivos de importancia agronómica (Walterson y Stavrinides, 2015).

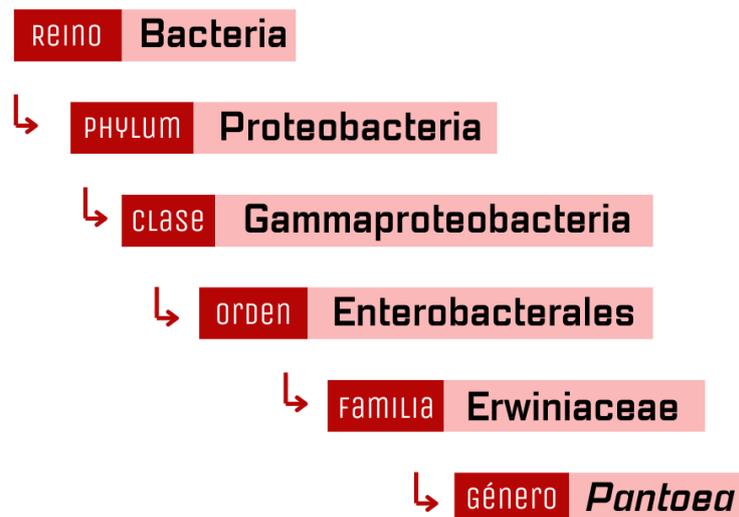


Figura 29. Taxonomía del género *Pantoea* (EPPO, 1998c).

Las posibles aplicaciones de estas bacterias son variadas y de gran utilidad, incluyendo posibilidades como la biorremediación (Pileggi *et al.*, 2012), el uso en diferentes tratamientos médicos (Walterson y Stavrinides, 2015) y, por supuesto, el control biológico de enfermedades, por ejemplo, en manzano y peral frente a *Erwinia amylovora* Burrill y *Pectobacterium carotovorum* Smith (Johnson *et al.*, 1993, 2000; Schnyder *et al.*, 2022).

El potencial para la aplicación sobre cultivos del género *Pantoea* reside en dos tipos de efectos beneficiosos sobre las plantas: su capacidad para promover el crecimiento, al ser

consideradas PGPR (Bhat et al., 2022), y su acción antibiótica frente a ciertos patógenos (Walterson y Stavrínides, 2015). Esta acción se basa en la producción de diversos compuestos antibióticos, como pantocinas, microcinas o phenazinas (Giddens *et al.*, 2002; Vanneste *et al.*, 2002; Wright y Beer, 2002).

Existen en el mercado varios formulados a base de cepas de *Pantoea*, como Ban C9-1, formulado con *P. vagans* C9-1, y Bloomtime Biológica, con *P. agglomerans* E325 (Johnson y Stockwell, 1998; Pusey, 2002).

Los usos potenciales de *Pantoea* para el control biológico son diversos. Así, se ha probado su efectividad en cultivos como manzano, peral, cítrico, lenteja, patata, remolacha, colza, tomate, soja y otros. También se ha comprobado su acción frente a diversos patógenos como *E. amylovora*, *B. cinerea*, *Aspergillus flavus* Link, *Xanthomonas campestris* Pammel o *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter (Walterson y Stavrínides, 2015).

En cuanto al control de *P. syringae* se han realizado ensayos con éxito utilizando *P. agglomerans* frente a *P. syringae* pv. *maculicola* en *Arabidopsis*, donde se constató la activación de la respuesta SAR (Zhang et al., 1998), y se ha identificado esta especie con potencial de biocontrol frente a *P. syringae* pv. *glycinea* en cultivos de soja (Volksch *et al.*, 1993).

1.5.5. *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* (Figura 31), descrito por primera vez en 1894 por Migula, cuenta en la actualidad con 313 especies (Parte *et al.*, 2020), agrupa a bacterias Gram-negativas, aeróbicas, con flagelos móviles y un tamaño de célula entre 0.5–1.0 μm \times 1.5–5.0 μm ; tiene bajos requerimientos nutricionales, lo que las hace ubicuas (Nerek y Sokołowska, 2022).

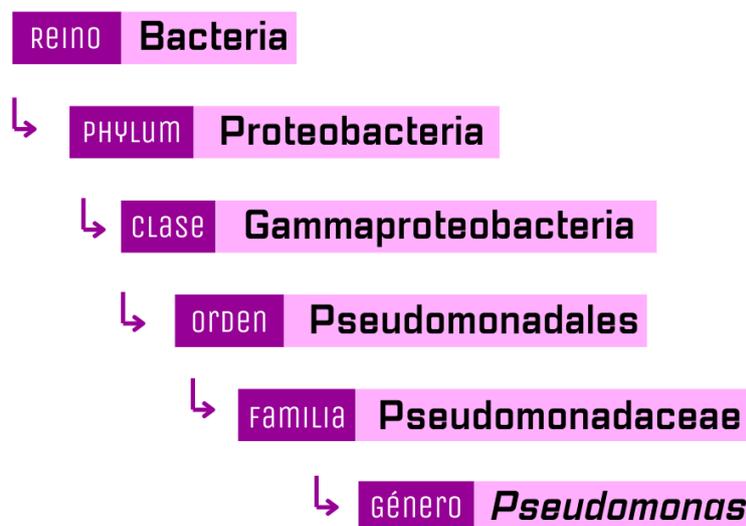


Figura 30. Taxonomía del género *Pseudomonas* (EPPO, 1998d).

Debido a esto, bacterias de este género se han aislado de multitud de ambientes, como agua, suelo, animales y plantas, desarrollando asociaciones especializadas con estos dos últimos (Gross y Loper, 2009). Pueden encontrarse presentes en la endospermosfera, espermosfera, endosfera, filosfera y, mayoritariamente, la rizosfera (Müller y Behrendt, 2021).

Sus aplicaciones en la agricultura se deben a sus tres principales modos de acción:

- La **inducción de resistencia y favorecimiento del crecimiento**. En caso de encontrarse en la rizosfera, son consideradas PGPR, pero aquellas que se encuentran en los tejidos vegetales se consideran bacterias endofíticas promotoras del crecimiento, o 'plant growth-promoting endophytic bacteria' (PGPBE) (Guzmán-Guzmán y Santoyo, 2022). Son igualmente capaces de desencadenar la respuesta ISR, caracterizada por la activación de los mecanismos de defensa latentes de la planta, que se manifiestan cuando están expuestas a un patógeno (Pieterse *et al.*, 2014).
- **Competición** por espacio y micronutrientes (Pieterse *et al.*, 2014).
- **Antibiosis**: producción de diversos compuestos con capacidad antibiótica, siendo los más conocidos 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), phenazinas, pyrrolnitrin, pyoluteorin, 2-hexyl, 5-propyl resorcinol y 7-hydroxytropolona (Girard *et al.*, 2020; Biessy y Filion, 2021; Müller y Behrendt, 2021; Raio y Puopolo, 2021; Oni *et al.*, 2022).

Ciclo de vida de *Pseudomonas* asociada a plantas

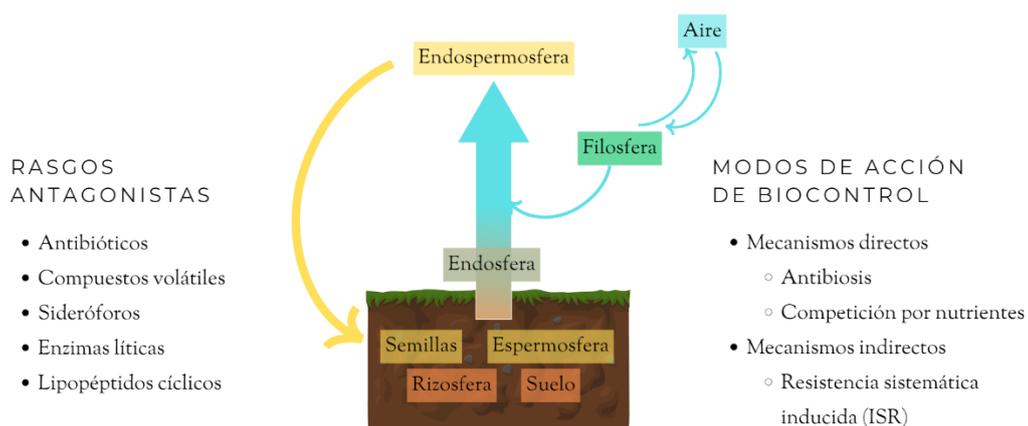


Figura 31. Asociación a las plantas, rasgos antagonistas y modos de biocontrol de *Pseudomonas* spp. Elaboración propia a partir de Müller y Behrendt, 2021.

Debido a estas cualidades, cepas de bacterias del género *Pseudomonas* han demostrado potencial para el control biológico de distintas plagas y enfermedades que afectan a diversos cultivos, como por ejemplo *Thielaviopsis basicola* en tabaco, *Phytophthora infestans* en patata, *Fusarium oxysporum* en tomate o *Erwinia amylovora* en manzano (Müller

y Behrendt, 2021). También destaca su efectividad frente a insectos, ya que para tratar plagas de pulgones, langostas o saltamontes y diversas larvas, existen productos comerciales con *Pseudomonas* como materia activa (Teoh *et al.*, 2021).

En cuanto a su posible efectividad frente a *P. syringae* pv. *phaseolica*, se ha observado que la presencia previa en raíces de *P. fluorescens* S97 desencadenó la respuesta ISR en hojas (Alstrom, 1995; Pieterse *et al.*, 2014), así como la eficacia *in vitro* e *in vivo* de cepas de *P. fluorescens* y *P. putida* frente a *P. syringae* pv. *phaseolica* (Dönmez y Aliyeva, 2022).

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es determinar los efectos de diversos agentes de control biológico y sus metabolitos secundarios frente a *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* en vainas de judía.

Los objetivos específicos son:

- Determinar el control de diferentes aislados de *Trichoderma* y sus metabolitos frente a *P. syringae* pv. *phaseolicola*.
- Determinar el control de un aislado de *Pantoea* y sus metabolitos frente a *P. syringae* pv. *phaseolicola*.
- Determinar el control de un aislado de *Bacillus* y sus metabolitos frente a *P. syringae* pv. *phaseolicola*.
- Determinar el control de un aislado de *Pseudomonas* y sus metabolitos frente a *P. syringae* pv. *phaseolicola*.
- Determinar el momento de aplicación óptimo de los agentes de biocontrol y sus metabolitos para el control de *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material

Vainas de judía verdes

Caldo de Patata Dextrosa (PDB) (Condalab, España)	Medio de cultivo King B (Sigma-Aldrich, Alemania)	Medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (PDA) (Sigma-Aldrich, Alemania)
Tubos Eppendorf de 1,5 ml	Tubos Falcon de 50 ml	Placas Petri de 90 mm de diámetro
Aguja de siembra	Asas de siembra (L y loop)	Vasos Erlenmeyer
Micropipetas	Puntas de micropipeta	Pinzas
Mechero Bunsen	Filtro de tela	Papel de filtro
Bandejas	Gradillas	
Espectrofotómetro (Denovix)	DS-11+	Campana microbiológica de flujo laminar
Estufa de cultivo		
Centrífuga Eppendorf		

3.2. Método

3.2.1. Diseño experimental

Se planteó un diseño experimental por bloques para cada uno de los agentes de control biológico, en preventivo y dual. En el caso de preventivo, la aplicación del agente de control se realizó 48 horas antes de la inoculación patógeno, y co-inoculación o dual en el mismo momento. Los agentes de biocontrol que se probaron, así como los métodos de aplicación de cada uno, fueron los de la Tabla 1.

Tabla 1. Agentes de biocontrol utilizados y sus aplicaciones.

Agente	Especie	Aplicación directa	Aplicación metabolitos
T019	<i>Trichoderma harzianum</i>		
T059	<i>Trichoderma harzianum</i>	Solución de esporas con concentración 10^6 esporas/ml.	Solución líquida en PDB para aplicar los metabolitos liberados.
T014	<i>Trichoderma virens</i>		
T032	<i>Trichoderma virens</i>		
Bac02	<i>Bacillus subtilis</i>	Solución de bacterias en suspensión donde a 600 nm la absorbancia sea entre 1,10 y 1,19 UA	
Pan03	<i>Pantoea agglomerans</i>		
Ps06	<i>Pseudomonas koreensis</i>		

La inoculación fue *in vivo* sobre vainas de judía verdes, cada una con 12 puntos de inoculación, 3 de cada uno de los 4 tratamientos estructurados en bloques. Para cada agente hubo 8 vainas, para las cuales la distribución de los bloques de tratamiento fue aleatoria en cada una. Los tratamientos para cada agente y modo de aplicación fueron:

- Patógeno y agente (T1): inoculación del patógeno y agente de biocontrol.
- Control del agente (T2): inoculación del agente de control biológico y agua.
- Control positivo (T3): inoculación de agua y patógeno.
- Control negativo (T4): aplicación de agua, sin patógeno ni agente de biocontrol.

Para cada tratamiento se aplicó 10 µl en cada uno de los tres orificios correspondientes realizados con la punta de una micropipeta. Por lo tanto, las inoculaciones para cada agente y modo de aplicación fueron las siguientes:

Tabla 2. Aplicaciones en preventivo (Ps01= *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*; Agente BC = agente de biocontrol).

Código	Día 0	48 h después
T1	Agente BC	Ps01
T2	Agente BC	H ₂ O
T3	H ₂ O	Ps01
T4	H ₂ O	H ₂ O

Tabla 3. Aplicaciones duales (Ps01= *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*; Agente BC = agente de biocontrol)

Código	Día 0	
T1	Agente BC	Ps01
T2	Agente BC	H ₂ O
T3	H ₂ O	Ps01
T4	H ₂ O	H ₂ O

3.2.2. Esporas de *Trichoderma* spp.

Los aislados de *Trichoderma*, conservados a -80 °C en glicerol en forma de esporas, se sembraron en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio PDA añadiendo 50 µl de cada aislado. Tras 7 días en estufa de cultivo 25 °C y en condiciones de oscuridad se resembraron en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio PDA (Figura 32). Pasados otros 7 días a 25 °C, se procedió a la extracción de esporas.

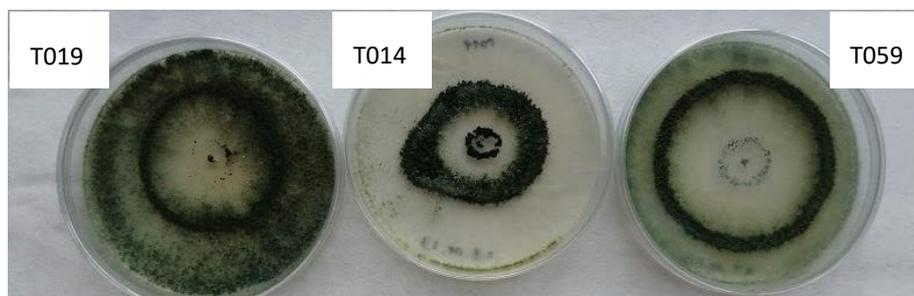


Figura 32. *T. harzianum* T019, *T. virens* T014 y *T. harzianum* T059 en placas Petri con medio patata-dextrosa-agar (PDA) tras 7 días en estufa a 25 °C. Elaboración propia.

Para obtener las esporas se añadieron 5 ml de agua destilada autoclavada (121 °C 20 min) a cada una de las placas Petri, y con un asa de siembra en L se rascó la superficie del micelio para provocar el desprendimiento de las esporas. La solución de agua y esporas obtenida se pipeteó en un tubo Falcon de 50 ml, pasando previamente por un filtro de tela, con el fin de evitar que pasasen elementos que no fuesen esporas, como fragmentos de micelio o de medio.

Posteriormente, se determinó la concentración de esporas por ml con una cámara de Neubauer y se diluyeron las soluciones obtenidas para conseguir 2 ml a concentración 10^6 esp/ml.

3.2.3. Obtención de metabolitos de *Trichoderma* spp.

En primer lugar, se obtuvieron las esporas de los aislados de *Trichoderma* siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior.

A partir de las soluciones de esporas obtenidas se inocularon vasos Erlenmeyer con medio PDB (uno para cada aislado) de manera que el volumen final de cada uno fuese 150 ml y su concentración 10^6 esp/ml.

Tras una semana a temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 20 °C), parte del contenido de cada vaso Erlenmeyer (Figura 33) se volcó en un tubo Falcon de 50 ml. A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 4.200 rpm. Por último, se pipeteó el sobrenadante, donde se encontraban los diversos metabolitos producidos por *Trichoderma*, reservándose hasta su aplicación.

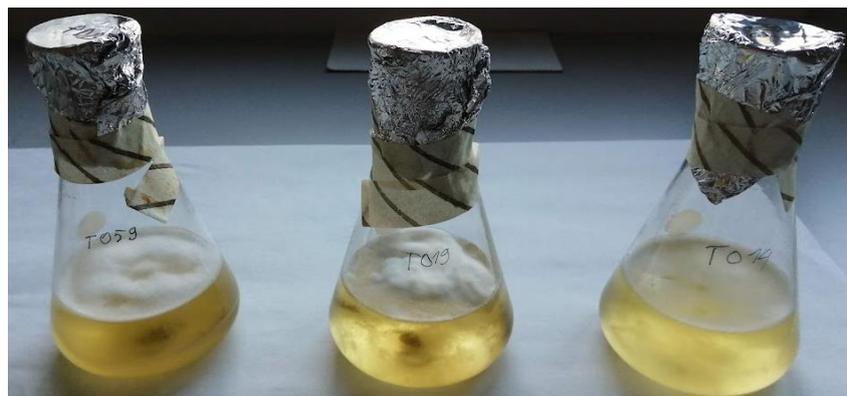


Figura 33. Vasos Erlenmeyer 7 días después de ser inoculado el medio de cultivo patata-dextrosa (PDB) que contienen con esporas de *Trichoderma*. Elaboración propia.

3.2.4. Bacterias de control biológico.

En primer lugar, se sembraron 50 ul de solución de bacterias conservadas a -20°C en placas Petri de 90 mm de diámetro con medio King B. Pasadas 72 horas en estufa de cultivo a 25 °C, se procedió a refrescar cada una de ellas en placas iguales que las anteriores.

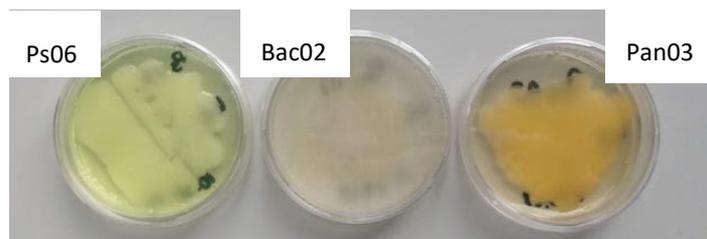


Figura 34. *P. koreensis* Ps06, *B. subtilis* Bac02 y *P. agglomerans* Pan03 en placas Petri con medio King B tras 72 horas en estufa a 25 °C. Elaboración propia.

Tras 48 horas a 25 °C, se procedió a la obtención de solución de bacterias. Se añadieron 3 ml de agua destilada autoclavada (121 °C 20 min) en cada una de las placas, raspando la superficie con un asa de siembra en L y se transfirió a tubos Eppendorf. Se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, y se añadió 1 ml de agua destilada autoclavada a cada Eppendorf, para resuspender la parte sólida, repitiendo este proceso una vez más. Se utilizó la dilución 10^{-2} .

3.2.5. Obtención de metabolitos de las bacterias de control biológico.

Para la obtención de las bacterias se siguió el procedimiento descrito en el anterior apartado. Tras 48 horas de desarrollo de las bacterias en medio King B a 25 °C se traspasó una dilución 10^{-2} de la disolución madre a vasos Erlenmeyer con 150 ml de medio PDB. Posteriormente se siguió en procedimiento descrito en el apartado 4.2.3.

3.2.6. Obtención de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* para su aplicación.

El procedimiento seguido fue el descrito en el apartado 3.2.4.

3.2.7. Inoculación y evaluación en vainas de judía.

La inoculación se realizó mediante pequeños orificios hechos con punta de micropipeta en cada punto de aplicación y añadiendo 10 μ l ya sea de solución de esporas de *Trichoderma*, de metabolitos de éste, de bacterias de control biológico, de metabolitos de éstas, de la bacteria patógena *P. syringae* pv. *phaseolicola* o de agua destilada (Figura 35). La inoculación de los controles se realizó con agua destilada autoclavada.

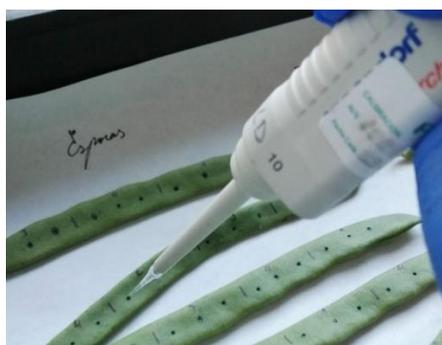


Figura 35. Inoculación de un tratamiento con ayuda de una micropipeta. Elaboración propia.



Figura 36. Vainas inmediatamente después de la inoculación. Elaboración propia.

Tras la inoculación, las vainas se conservaron en condiciones controladas en una cámara de cultivo, con temperatura de 25 °C y humedad relativa del 50 %.

Se realizaron las evaluaciones de cada tratamiento a los 2 y 5 días tras la inoculación del patógeno. Se midieron dos diámetros perpendiculares de los halos formados en torno a las heridas (Figura 37) mediante el software ImageJ.

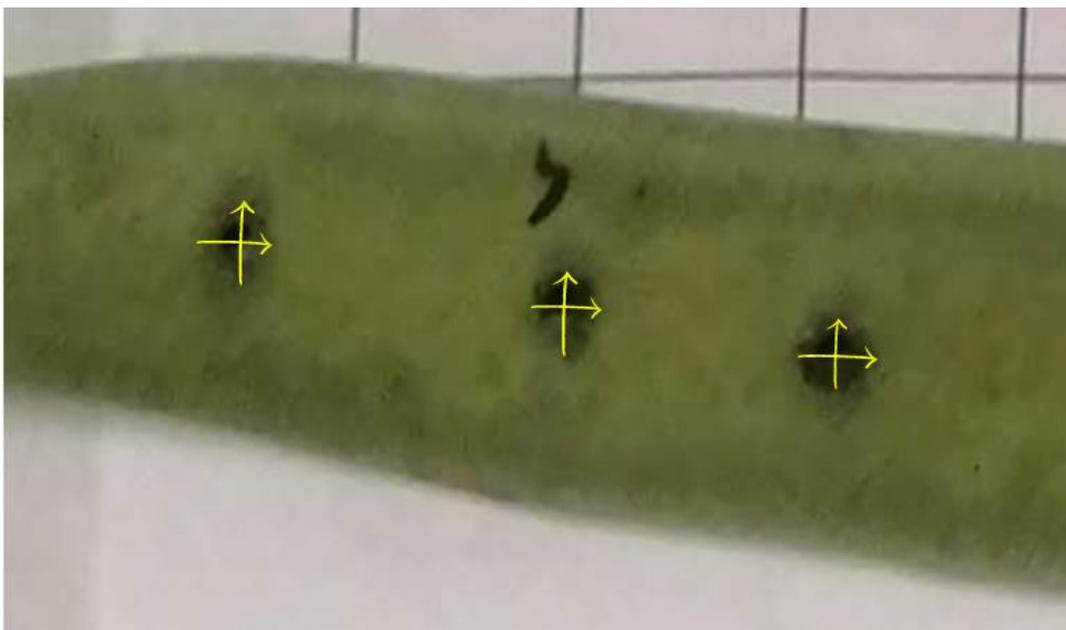


Figura 37. Mediciones realizadas sobre halos en vainas de judía tras 5 días. Elaboración propia.

3.2.8. Análisis estadísticos

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante una prueba de normalidad, un análisis de varianza de una vía y de dos vías (ANOVA) y comparación de medias mediante la prueba de rango múltiple de Duncan de cada aislado y tipo de inoculación con el programa informático IBM SPSS Statistics for Windows Version 26.0 (IBM Corp.: Armonk, NY, USA).

4. RESULTADOS

Se observó la generación de dos tipos diferenciados de halo alrededor de los puntos de inoculación: en aquellos puntos donde se aplicaron metabolitos, excepto para *P. agglomerans* Pan03, se generó un halo tenue, considerado 'halo I' (Figura 38, a), y donde se aplicó *P. syringae* pv. *phaseolica*, manchas oscuras aceitosas características de la enfermedad, en adelante, 'halo II' (Figura 38, b). Se han considerado para la obtención de resultados los datos obtenidos de las evaluaciones realizadas a los 5 días de la inoculación. Se ha utilizado para el tratamiento estadístico sólo el "halo II", presente tanto en tratamientos directos como por metabolitos.

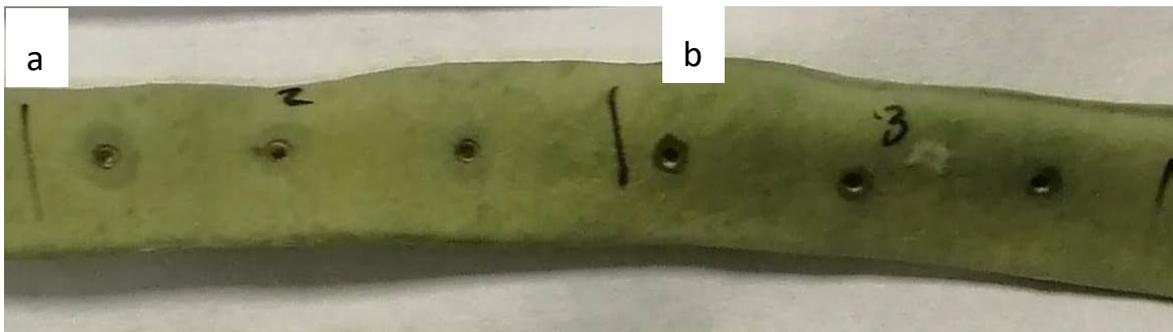


Figura 38. Halo I (a) y halo II (b) alrededor de puntos de inoculación en una vaina de judía.
Elaboración propia.

Debido a que en ningún tratamiento preventivo se han desarrollado síntomas en los controles positivos de los patógenos, se han descartado para el análisis estadístico, realizándose éste con las aplicaciones duales. Asimismo, se excluyen del análisis las vainas tratadas con *T. virens* T032, ya que se infectaron al completo, incluyendo los controles negativos (Figura 39a), extendiéndose por dentro la infección (Figura 39c) y encontrándose incluso micelio por dentro de las vainas (Figura 39d), además de haberse generado exudados. (Figura 39b).



Figura 39. Daños en las vainas con tratamiento *T. virens* T032. Daños en toda la vaina (a), daños en control negativo y exudados (b), daños dentro de la vaina (c), micelio dentro de la vaina (d).
Elaboración propia.

Se ha observado igualmente daños generados por *P. agglomerans* Pan03, siendo estos halos tipo II, similares a los de la grasa, en el control positivo del agente de biocontrol. Se aprecian en la Figura 40.



Figura 40. Daños en T2, el control positivo de *P. agglomerans* Pan03.

Se exponen en la Tabla 4 las medias de los halos de cada tratamiento, junto con sus errores estándares, así como del control positivo del patógeno.

Tabla 4. Medias de los diámetros de halos obtenidos junto con error estándar.

Aislado	Halo aplicación directa (mm)	Halo aplicación metabolitos (mm)
<i>B. Subtilis</i> Bac02	2,7981 ±0,12698	3,2091 ±0,10470
<i>P. Agglomerans</i> Pan03	3,6753 ±0,20103	3,3275 ±0,14822
<i>P. koreensis</i> Ps06	2,9229 ±0,10717	2,6743 ±0,09523
<i>T. virens</i> T014	2,6270 ±0,09426	2,8535 ±0,10413
<i>T. harzianum</i> T019	3,0986 ±0,12608	2,7115 ±0,11353
<i>T. harzianum</i> T059	3,6167 ±0,11317	2,9691 ±0,11356
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> Ps01 (C+)	3,3950 ±0,04110	

En el análisis en el que se compararon los diámetros de los halos tipo II producidos dependiendo del tipo de microorganismo utilizado, es decir, bacterias, hongos y el control positivo del patógeno, se vio que ambos tratamientos fueron efectivos, reduciendo significativamente el tamaño de halo en comparación con el control positivo, pero sin diferencias significativas entre los dos (Figura 41).

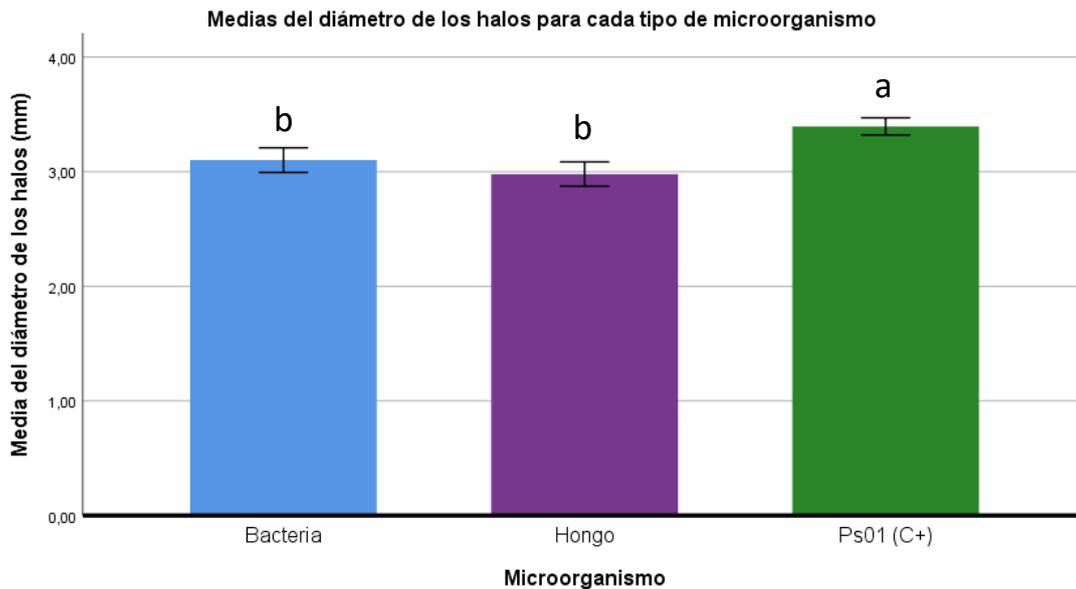


Figura 41. Diámetro de los halos (mm) alrededor del orificio de inoculación según el microorganismo utilizado. Color azul, bacterias. Color morado, hongo. Color verde para el control positivo con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica*, Ps01. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test Duncan, $p < 0,05$)

Comparando los valores obtenidos en función del modo de aplicación, ambos tipos de tratamiento, directo o por metabolitos, generaron halos tipo II significativamente menores que el control positivo del patógeno, siendo los correspondientes a los tratamientos por metabolitos significativamente menores que aquellos donde se realizó la inoculación directa (Figura 42).

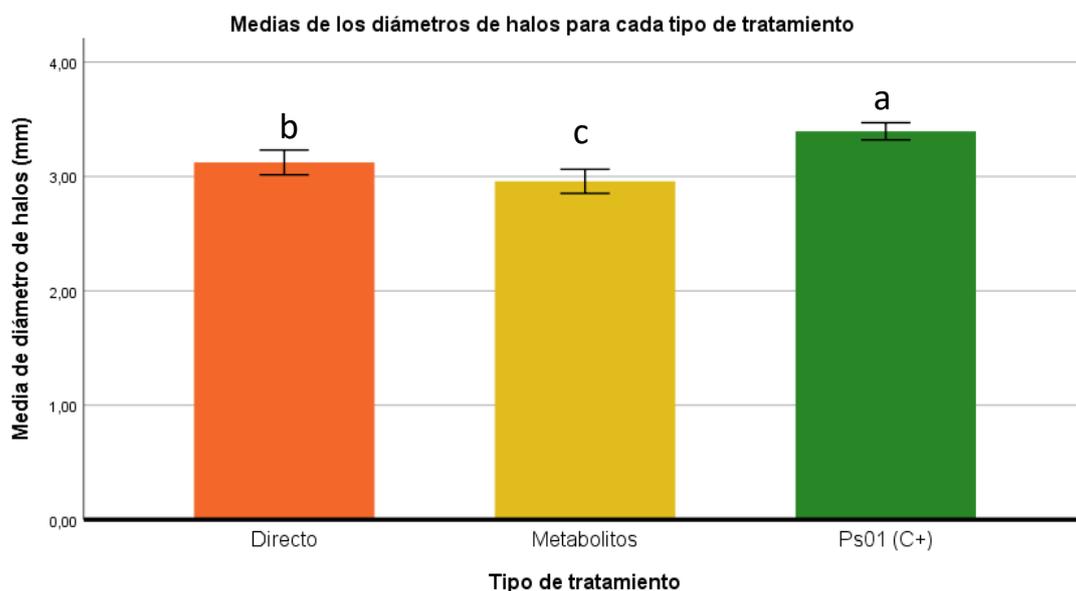


Figura 42. Diámetro de los halos (mm) alrededor del orificio de inoculación según el tipo de tratamiento utilizado. Color naranja, directo. Color amarillo, metabolitos. Color verde para el control positivo con *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica*, Ps01. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test Duncan, $p < 0,05$).

En la comparación de los aislados utilizados, independientemente del tipo de aplicación, se pueden distinguir dos subconjuntos: aquellos aislados en los diámetros de los halos no mostraron diferencias significativas respecto al control positivo del patógeno, compuesto por Pan03 y T059; y aquellos en los que la media del diámetro de los halos fue significativamente menor que en el control positivo, que fueron Bac02, T019, Ps06 y T014 (Figura 43).

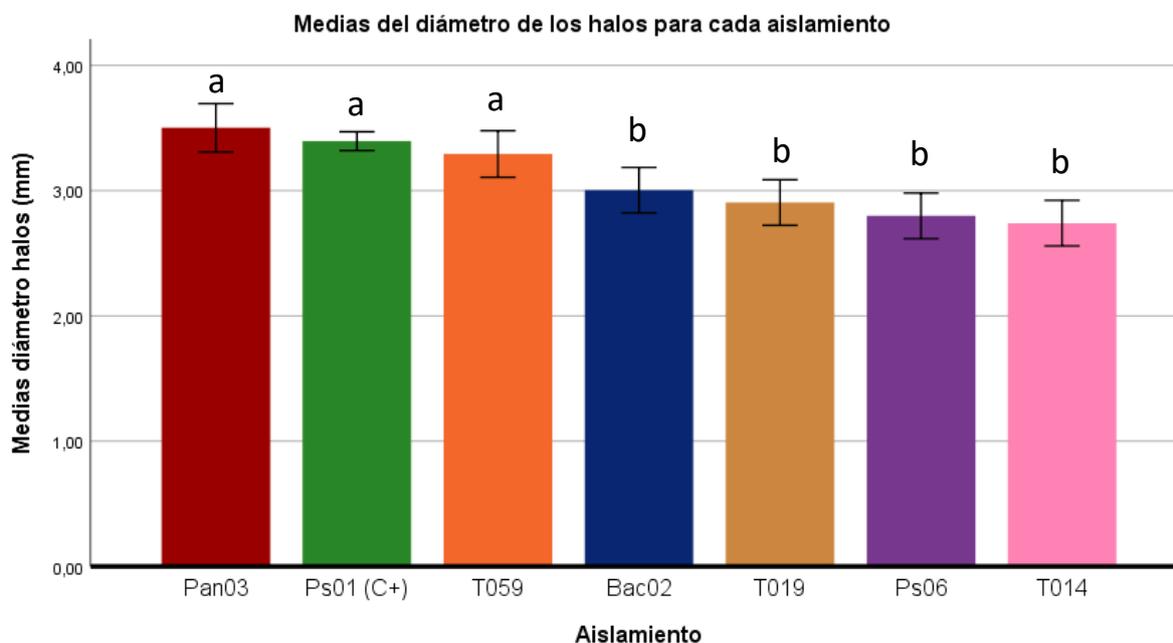
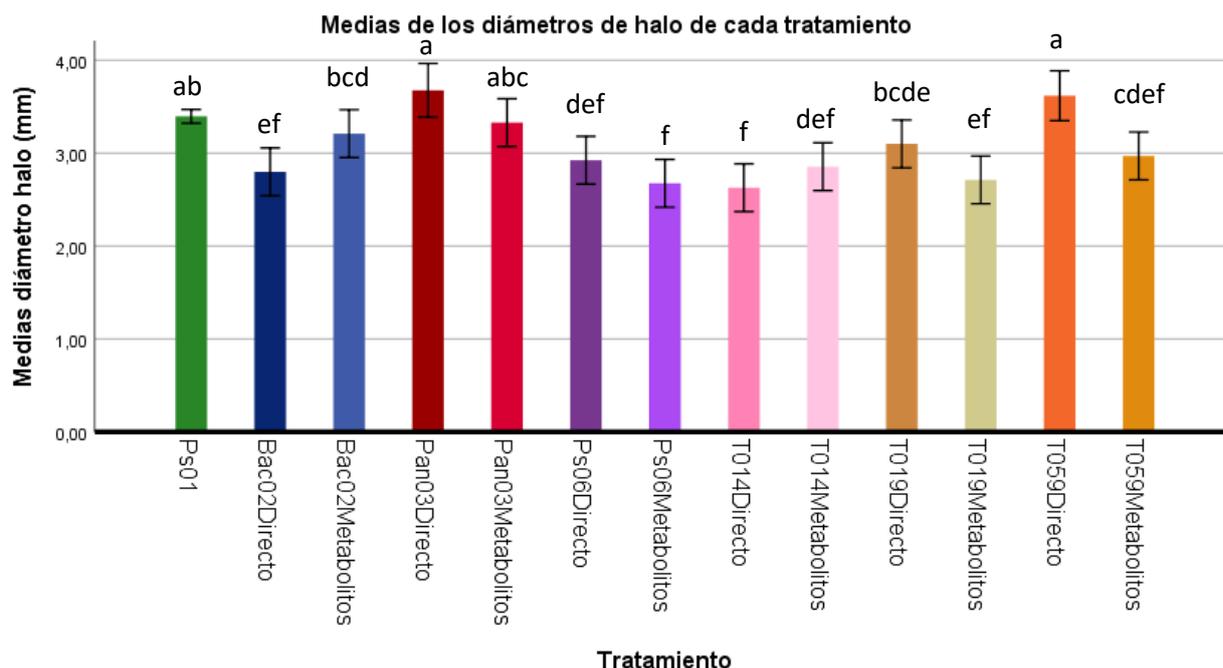


Figura 43. Diámetro de los halos (mm) alrededor del orificio de inoculación según el aislamiento utilizado. Color rojo, *P. agglomerans* Pan03. Color verde, *P. syringae* pv. *phaseolicola* Ps01 (C+). Color naranja, *T. harzianum* T059. Color azul, *B. subtilis* Bac02. Color marrón, *T. harzianum* T019. Color morado, *P. koreensis* Ps06. Color rosa, *T. virens* T014. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test Duncan, $p < 0,05$).

En cuanto a la interacción tipo de tratamiento – aislado, se pueden destacar los siguientes resultados (44):

- Los tratamientos directos con diámetros de halo significativamente menores que el control positivo del patógenos fueron *B. subtilis* Bac02, *P. koreensis* Ps06 y *T. virens* T014.
- Los tratamientos por metabolitos con diámetros de halo significativamente menores que el control positivo del patógenos fueron *P. koreensis* Ps06, *T. virens* T014, *T. harzianum* T019 y T059.
- El aislamiento para el cual el halo del tratamiento directo fue significativamente menor que el del tratamiento por metabolitos fue *B. subtilis* Bac02.
- El aislamiento para el cual el halo del tratamiento por metabolitos fue significativamente menor que el del tratamiento directo fue *T. harzianum* T059.



44. Diámetro de los halos (mm) alrededor del orificio de inoculación según el aislamiento y el tipo de tratamiento utilizado. Color verde, *P. syringae* pv. *phaseolicola* Ps01 (C+). Color azul, *B. subtilis* Bac02. Color rojo, *P. agglomerans* Pan03. Color morado, *P. koreensis* Ps06. Color rosa, *T. virens* T014. Color marrón, *T. harzianum* T019. Color naranja, *T. harzianum* T059. Para cada aislamiento, la tonalidad de color más oscura corresponde con el tratamiento directo y la más clara con el de metabolitos. Los valores con letras diferentes presentan diferencias significativas (test Duncan, $p < 0,05$)

Se mantuvieron en observación las vainas hasta pasados 7 días después de la inoculación y, gracias a esto, se pudo observar en el tratamiento con esporas de *T. virens* T014, la colonización por micelio de una de las vainas (Figura 45).



Figura 45. Vaina del tratamiento directo (con esporas) de *T. virens* T014 colonizada por micelio. Elaboración propia.

5. DISCUSIÓN

En la investigación en microbiología, los ensayos *in vivo* tienen gran importancia para descubrir métodos de actuación inesperados (Cox, 2001), ya que el tratamiento tiene efecto sobre el hospedador estudiado, de ahí la importancia de estudiar *in vivo* los posibles agentes de biocontrol que podrían utilizarse para controlar diversas plagas y enfermedades. En este caso, se han probado diversos agentes sobre vainas de *P. vulgaris* para comprobar su efectividad frente a *P. syringae* pv. *Phaseolicola*, patógeno causante de manchas aceitosas conocidas como 'grasa de la judía'.

En este ensayo se han probado siete BCAa: tres aislamientos de bacterias y cuatro de hongos, cada uno de ellos aplicado de forma directa o por esporas y por metabolitos, y se realizó el análisis estadístico en función del tipo de microorganismo utilizado (bacteria u hongo), del tipo de tratamiento (directo o metabolitos) y del aislamiento utilizado (*P. agglomerans* Pan03, *B. subtilis* Bac02, *P. koreensis* Ps06, *T. virens* T014, *T. harzianum* T019, *T. harzianum* T059), considerando igualmente las interacciones entre estos factores. Se realizaron además tratamientos en preventivo y co-inoculación o dual para cada uno de ellos.

Los ensayos realizados en preventivo no llegaron a manifestar en ningún caso signos de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, ni siquiera en los controles positivos de los patógenos, razón por la que se descartaron para el análisis estadístico y no se han tenido en cuenta a la hora de exponer los resultados. Esto pudo deberse a un cambio de condiciones respecto a las aplicaciones duales: tras la inoculación de los BCAs en preventivo, las vainas se llevaron a cámaras de cultivo, mientras que las vainas sobre las que se realizarían después las aplicaciones duales permanecieron en el frigorífico. Por lo tanto, si bien es cierto que la inoculación del patógeno se realizó al mismo tiempo para ambos casos, las vainas de los tratamientos preventivos llevaban ya dos días en las cámaras, donde posiblemente perdieron humedad por la mayor temperatura, impidiendo después el desarrollo del patógeno. Se propone por lo tanto una ampliación de este ensayo repitiendo los tratamientos en preventivo asegurando una humedad más elevada previa a la inoculación del patógeno, para poder comprobar la efectividad de estos BCAs si se realizase una aplicación preventiva.

Se descartaron también para el análisis los tratamientos realizados con *T. virens* T032, debido a la infección completa de las vainas, que replicó en todos los tratamientos los síntomas de *P. syringae* pv. *phaseolicola* y generó exudados. Estos problemas se achacaron a condiciones previas de las vainas, ya que muchas presentaron síntomas en los controles negativos, incluyendo exudados, y se vieron infectadas las vainas al completo, extendiéndose la infección hacia el interior. La utilización de vainas con más días de antigüedad pudo favorecer la aparición de problemas ya presentes, así como las condiciones en las que estuvieron, diseñadas para favorecer el crecimiento de patógenos. Debido a la efectividad de

los otros aislados de *Trichoderma* ensayados, una repetición de este ensayo sería una ampliación pertinente.

Destaca también la distribución estadística observada en las medidas tomadas de los halos: en la mayoría de los casos, las mediciones de los diámetros de los halos creados por *P. syringae* pv. *phaseolicola* no se ajustaban a una distribución normal, a pesar de contar con un gran número de medidas, por lo que se debieron utilizar en la mayoría de los casos pruebas no paramétricas para el análisis estadístico. Incluso para las mediciones de los halos correspondientes al control positivo del patógeno, con un tamaño muestral de 248 mediciones, la distribución que se observó en la mayoría de los tratamientos tenía el valor modal desplazado a la izquierda del centro de su rango, asemejándose más bien a una función del tipo Beta. Cabría estudiar en mayor profundidad si éste es un fenómeno que efectivamente no se ajusta a una distribución normal y comprobar su ajuste a otras distribuciones.

En cuanto a los análisis estadísticos realizados, en primer lugar, ambos tipos de microorganismos utilizados presentaron diferencias significativas respecto al control, pero no entre ellos. Según el tipo de tratamiento, sí hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos: metabolitos, directo y control, siendo ambos efectivos, pero aquel realizado por metabolitos más efectivo que el directo, ya que el diámetro de los halos generados era significativamente menor. La mayor efectividad de este tipo de aplicación puede deberse a la gran batería de compuestos que son capaces de generar estos géneros de BCAs. Por ejemplo, enzimas líticas, antibióticos volátiles, compuestos solubles en agua y peptaiboles en el caso de *Trichoderma* (Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991; Marra *et al.*, 2006; Vinale *et al.*, 2008); pantocinas, microcinas o phenazinas producidas por *Pantoea* (Giddens *et al.*, 2002; Vanneste *et al.*, 2002; Wright y Beer, 2002); y 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), phenazinas, pyrrolnitrin, pyoluteorin, 2-hexyl, 5-propyl resorcinol y 7-hydroxytropolona producidos por *Pseudomonas* (Girard *et al.*, 2020; Biessy y Filion, 2021; Müller y Behrendt, 2021; Raio y Puopolo, 2021; Oni *et al.*, 2022).

Sin embargo, se debe considerar para este tipo de tratamiento por metabolitos la aparición de los halos de tipo I, más tenues que los provocados por la grasa. La causa exacta de esto es desconocida, pero podría deberse a que la sustancia inoculada fue el extracto crudo de los microorganismos, sin haberse realizado una destilación o filtración precisa de sus metabolitos ni una identificación de éstos, por lo que otros compuestos presentes en este extracto podrían haber causado estos daños. Una futura línea para realizar ensayos sería la obtención más precisa de los metabolitos que demostraron su eficacia para comprobar si siguen provocando la aparición de estos halos.

Tras realizar las comparaciones dependientes del tipo de aislado, se vio que no había diferencias significativas respecto al control positivo en dos de ellas: *T. harzianum* T059, y *P. agglomerans* Pan03. Si bien es cierto que en el análisis que incluía la interacción con el modo de aplicación el tratamiento con metabolitos de *T. harzianum* T059 resultó efectivo, no fue este el caso para *P. agglomerans* Pan03, que no sólo no mostró diferencias significativas frente al control de *P. syringae* pv. *phaseolica*, sino que además causó daños en su propio control positivo, donde sólo se inoculó *P. agglomerans* Pan03. No se han encontrado en la literatura científica referencias a *Pantoea* como patógeno de *P. vulgaris*, aunque sí está reconocido como dañino para multitud de otras especies, entre ellas de la familia *Fabaceae*, como *Vigna marina*, a la cual causa necrosis (Walterson y Stavrinides, 2015). Sería apropiado realizar ensayos de patogenicidad con esta cepa para comprobar los daños que puede causar.

Los aislamientos para los cuales el diámetro del halo alrededor del orificio de inoculación sí fue significativamente menor que para el control positivo del patógeno fueron *B. subtilis* Bac02, *P. koreensis* Ps06, *T. virens* T014 y *T. harzianum* T019. Sin embargo, teniendo en cuenta la interacción con el tipo de tratamiento, *T. harzianum* T059 también demostró ser efectivo aplicando sus metabolitos. Entrando en más detalle para el resto de los aislamientos efectivos, sabemos que fue efectivo un tratamiento sólo mediante aplicación directa, *B. subtilis* Bac02; dos los fueron únicamente por aplicación de metabolitos, *T. harzianum* T019 y T059; y otros dos fueron efectivos en ambos tipos de aplicación: *P. koreensis* Ps06 y *T. virens* T014. Por lo tanto, se puede afirmar que fueron efectivos reduciendo el tamaño de los halos generados por *P. syringae* pv *phaseolicola* siete tratamientos de los 12 analizados: por aplicación de metabolitos de *P. koreensis* Ps06, *T. virens* T014, *T. harzianum* T019 y T059; y por aplicación directa o de esporas de *B. subtilis* Bac02, *P. koreensis* Ps06, *T. virens* T014.

La efectividad de estos aislamientos está respaldada por la bibliografía, como en el caso de *B. subtilis*, Bac02. Ha quedado demostrada la efectividad de varias bacterias de este género frente a *P. syringae* pv. *phaseolica* tanto *in vitro* como *in vivo*, entre las cuales se encuentra *B. subtilis*, siendo el resto *B. alcalophilus*, *B. atrophaeus*, *B. megaterium* y *B. mycooides*. En los ensayos *in vitro* demostraron crear halos de inhibición frente a este patógeno de entre 1,97 y 43,13 mm, mientras que *in vivo*, con la aplicación de cepas de estas bacterias pulverizándolas en hojas, redujeron el desarrollo de *P. syringae* pv. *phaseolica* entre un 50,15 y un 75,21% respecto al control (Dönmez y Aliyeva, 2022).

En el caso de *Trichoderma*, para el que todos los aislados analizados redujeron por lo menos en un tipo de aplicación los halos generados en torno al punto de inoculación, se encuentra en bibliografía instancias en las que especies de este género han sido eficaces

frente a otros patovares de *P. syringae*. Por ejemplo, frente a *P. syringae* pv. *syringae*, una mezcla comercial de tres cepas (*T. viride*, cepa T-26, *T. harzianum*, cepa T-22, y *T. longibrachiatum*, cepa T-397) mostró halos de inhibición del patógeno *in vitro*, y reducción del tamaño de los chancros ocasionados por este patógeno en cerezo *in vivo* (Moya-Elizondo *et al.*, 2019). De igual manera, la inoculación radicular de *Trichoderma* sp. en kiwi demostró efectividad al reducir los síntomas causados por *P. syringae* pv. *actinidae* (Hill *et al.*, 2015). Por último, se ha demostrado la efectividad de *T. asperellum* frente a *P. syringae* pv. *lacrymans* en pepino, al inducir la resistencia sistemática de la planta (Yedidia *et al.*, 2003). Esta eficacia puede deberse tanto a los compuestos antibióticos que es capaz de producir este género, como a otros mecanismos, como la competición por espacio y nutrientes (Vinale *et al.*, 2008).

Se deben tener en cuenta en los tratamientos con *Trichoderma* los posibles problemas que puedan desencadenar, como fue el caso con el tratamiento con esporas de *T. virens* T014, ya que se observó el crecimiento de micelio sobre una de las vainas. Por lo tanto, si bien produce diferencias significativas en el desarrollo del patógeno, la aplicación de esporas de T014 puede ser perjudicial. Casos similares de colonización de micelio, en los que *Trichoderma* puede llegar a actuar como patógeno se han observado en setas cultivadas (Kredics *et al.*, 2021) y en maíz (Pfordt *et al.*, 2020).

El aislamiento *P. koreensis* Ps06 demostró ser efectivo para reducir los halos formados por *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Esta misma especie ha sido utilizada con éxito frente a bacterias de este mismo género, como *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, causante de la tuberculosis del olivo. En este caso, *P. koreensis*, cepa HZEN27 demostró inhibición del patógeno en ensayos duales, así como una reducción del 46,09 % respecto al control en la formación de agallas en plántones de olivo (Filiz Doksöz y Bozkurt, 2022). Otras bacterias de este género son efectivas frente a *P. syringae* pv. *phaseolicola*, como es el caso de *P. fluorescens* y *P. putida*, que en los ensayos *in vitro* generaban un halo de inhibición frente al patógeno, y en los ensayos *in vivo*, pulverizadas sobre hojas, disminuían el desarrollo de la enfermedad (Dönmez y Aliyeva, 2022).

Se han identificado, por lo tanto, cinco microorganismos con capacidad de biocontrol frente a *P. syringae* pv. *phaseolica*, ya sea mediante la aplicación de sus esporas, de una solución líquida que los contenga o de sus metabolitos.

Esto no sólo abre camino a nuevos ensayos e investigaciones conducidos a probar su efectividad en campo o sus mecanismos de actuación, sino también al desarrollo de nuevos métodos para controlar el problema que supone la grasa de la judía en la provincia de León. La obtención de nuevos aislamientos de microorganismos autóctonos con potencial para el

control biológico, o la combinación de los ya probados son opciones muy interesantes. Se ha demostrado que la asociación de diversos hongos del género *Trichoderma* con bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* tienen un efecto sinérgico en cuanto a los beneficios sobre las plantas, y su uso combinado como agentes de biocontrol tiene efectos similares a plaguicidas químicos (Poveda y Eugui, 2022).

Además, estos microorganismos no son sólo de interés por su potencial para el control biológico, sino también como favorecedores del crecimiento, ofreciendo por lo tanto más ventajas con su aplicación. Es el caso de *T. harzianum* T019, que ha demostrado incrementar el crecimiento de plántulas de judía respecto al control si se aplica el tratamiento a las semillas (Mayo *et al.*, 2015). En cuanto a *B. subtilis*, un tratamiento a las semillas mejora tanto la germinación como el crecimiento en condiciones normales y de salinidad (Lastochkina *et al.*, 2021). Por último, especies utilizadas para el control biológico y como PGPR del género *Pseudomonas* no sólo han aumentado factores como el crecimiento y el rendimiento de cultivos de judía, sino que además han demostrado sinergias con bacterias del género *Rizhobium*, formadoras de nódulos en el sistema radicular y fijadoras de nitrógeno (Yadegari *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2014).

Por lo tanto, las aplicaciones de estos microorganismos con potencial de control biológico son amplias y su utilización podría ser muy beneficiosa tanto para controlar la grasa de la judía como para obtener mayores crecimientos.

6. CONCLUSIONES

Las interacciones entre los microorganismos utilizados, el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* y las vainas de *P. vulgaris* han sido diversas y se describen a continuación:

Tanto los tratamientos con hongos como con bacterias fueron efectivos respecto al control positivo del patógeno.

Tanto los tratamientos directos como con metabolitos fueron efectivos respecto al control positivo del patógeno.

Los tratamientos con metabolitos fueron más efectivos que los efectuados con solución líquida de bacterias o esporas de hongo.

Los tratamientos con metabolitos efectivos respecto al control del patógeno fueron los efectuados con los aislamientos *Pseudomonas koreensis* Ps06, *Trichoderma virens* T014, *Trichoderma harzianum* T019 y T059.

Los tratamientos directos, bien de solución líquida de bacterias o por esporas de hongo, efectivos respecto al control del patógeno fueron los efectuados con los aislamientos *Bacillus subtilis* Bac02, *Pseudomonas koreensis* Ps06 y *Trichoderma virens* T014.

La aplicación de los metabolitos liberados por *Bacillus subtilis* Bac02, *Pseudomonas koreensis* Ps06, *Trichoderma virens* T014, *Trichoderma harzianum* T019 y T059 en medio de cultivo PDB supuso la aparición de halos tenues alrededor del orificio de inoculación tanto en los controles positivos del agente como en los tratamientos.

La cepa de *Pantoea agglomerans* Pan03 causó daños similares a los propios de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abubakar, Y., Tijjani, H., Egbuna, C., Adetunji, C. O., Kala, S., Kryeziu, T. L. y Patrick-Iwuanyanwu, K. C. (2019) "Pesticides, history, and classification", en *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*. Elsevier, pp. 29-42. doi:10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8.
- Almeida, O. A. C., de Araujo, N. O., Dias, B. H. S., de Sant'Anna Freitas, C., Coerini, L. F., Ryu, C. M. y de Castro Oliveira, J. V. (2023) "The power of the smallest: The inhibitory activity of microbial volatile organic compounds against phytopathogens", *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 13. doi:10.3389/fmicb.2022.951130.
- Alstrom, S. (1995) "Evidences of disease resistance induced by rhizosphere pseudomonad against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*", *J. Gen. Appl. Microbiol*, 41, pp. 315-325.
- Antonio Boto Fidalgo, J., Reinoso Sánchez, B. y Puente, M. (1995) "Recolección de la judía para grano", *Agricultura: Revista agropecuaria y ganadera*, 751, pp. 124-127.
- Antoszewski, M., Mierek-Adamska, A. y Dąbrowska, G. B. (2022) "The importance of microorganisms for sustainable agriculture—A review", *Metabolites*. MDPI, 12(11). doi:10.3390/metabo12111100.
- Arias Restrepo, J. Hernando., Rengifo Martínez, Teresita. y Jaramillo Carmona, Maribel. (2007) *Manual técnico: Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la producción de frijol voluble*. Medellín: FAO.
- Arnold, D. L., Lovell, H. C., Jackson, R. W. y Mansfield, J. W. (2011) "*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: From «has bean» to supermodel", *Molecular Plant Pathology*, 12(7), pp. 617-627. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00697.x.
- Bakker, P. A. H. M., Berendsen, R. L., Van Pelt, J. A., Vismans, G., Yu, K., Li, E., Van Bentum, S., Poppeliers, S. W. M., Sanchez Gil, J. J., Zhang, H., Goossens, P., Stringlis, I. A., Song, Y., de Jonge, R. y Pieterse, C. M. J. (2020) "The soil-borne identity and microbiome-assisted agriculture: looking back to the future", *Molecular Plant*. Cell Press, 13(10), pp. 1394-1401. doi:10.1016/j.molp.2020.09.017.
- Bhat, B. A., Tariq, L., Nissar, S., Islam, S. T., Islam, S. U., Mangral, Z., Ilyas, N., Sayyed, R. Z., Muthusamy, G., Kim, W. y Dar, T. U. H. (2022) "The role of plant-associated rhizobacteria in plant growth, biocontrol and abiotic stress management", *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley and Sons Inc, pp. 2717-2741. doi:10.1111/jam.15796.
- Biessy, A. y Filion, M. (2021) "Phloroglucinol derivatives in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: Biosynthesis, regulation, and functions", *Metabolites*. MDPI AG, 11(3). doi:10.3390/metabo11030182.
- Biondi, E., Galipolli, L., Mazzaglia, A., Fuentealba, S. P., Kuzmanovic, N., Bertacinni, A. y Balestra, G. M. (2021) "*Bacillus*-based products for management of kiwifruit bacterial canker", *Phytopathologia Mediterranea*, 60(2), pp. 215-228. doi:10.36253/phyto-12184.
- Cai, F. y Druzhinina, I. S. (2021) *In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of Trichoderma*, *Fungal Diversity*. Springer Netherlands. doi:10.1007/s13225-020-00464-4.
- Cardoza, R. E., McCormick, S. P., Lindo, L., Mayo-Prieto, S., González-Cazón, D., Martínez-Reyes, N., Carro-Huerga, G., Rodríguez-González, Á., Proctor, R. H., Casquero, P. A. y Gutiérrez, S. (2022) "Effect of farnesol in *Trichoderma* physiology and in fungal-plant interaction", *Journal of Fungi*, 8(12), p. 1266. doi:10.3390/jof8121266.
- Carson, R. (1962) *Silent Spring*. Greenwich: Fawcett Publications.
- Casquero, P. : A., Santalla, M. y De Ron, A. M. (1994) "Cultivo asociado judía-maíz. Su papel dentro de una agricultura sostenible en Galicia", *Agricultura: Revista Agropecuaria*, 742, pp. 397-401.

Comisión Europea (2023) *Farm to Fork targets - Progress, Sustainable Use of Pesticides*. Disponible en: https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/sustainable-use-pesticides/farm-fork-targets-progress_en (Accedido: 19 de junio de 2023).

Consejo Regulador de la IGP «Alubia de La Bañeza-León» (2023) *Alubia Canela, Alubia Plancheta, Alubia Riñón, Alubia Pinta., Nuestros productos*. Disponible en: <https://www.alubiadelabanezaleon.es/nuestros-productos/> (Accedido: 21 de junio de 2023).

Cox, P. A. (2001) "Pharmacology, Biodiversity and", *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier, pp. 523-536. doi:10.1016/B0-12-226865-2/00221-2.

Debouck, D. G. y Hida, R. (1984) "Morfología de la planta del frijol común. Guía de estudio.", *CIAT*, pp. 7-41.

Dönmez, M. F. y Aliyeva, Z. (2022) "Biological control of bean halo blight disease (*Pseudomonas Savastanoi* Pv. *Phaseolicola*) with antagonist bacterial strains", *Gesunde Pflanzen*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. doi:10.1007/s10343-022-00746-8.

Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V. y Kubicek, C. P. (2011) "Trichoderma: The genomics of opportunistic success", *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), pp. 749-759. doi:10.1038/nrmicro2637.

EPPO (1998a) *EPPO Global Database*. Disponible en: <https://gd.eppo.int/taxon/1TRCDG> (Accedido: 1 de septiembre de 2022).

EPPO (1998b) *EPPO Global Database*. Disponible en: <https://gd.eppo.int/taxon/1BACIG> (Accedido: 6 de septiembre de 2022).

EPPO (1998c) *EPPO Global Database*.

EPPO (1998d) *EPPO Global Database*. Disponible en: <https://gd.eppo.int/taxon/1PSDMG> (Accedido: 6 de septiembre de 2022).

EPPO (2002) *EPPO Global Database*. Disponible en: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMSY> (Accedido: 6 de septiembre de 2022).

FAO (2018) *Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones*. Ciudad de Panamá.

FAO (2022) *Datos sobre alimentación y agricultura, FAOSTAT*.

Fernández de C., F., Gepts, P. y López, M. (1986) *Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (Phaseolus vulgaris L.)*. Cali: CIAT.

Fernández-Sanz, A. M., Rodicio, M. R. y González, A. J. (2016) "Pseudomonas syringae pv. phaseolicola isolated from weeds in bean crop fields", *Letters in Applied Microbiology*, 62(4), pp. 344-348. doi:10.1111/lam.12556.

Fidalgo, J. A. B., Reinoso Sánchez, B. y Alvarez García, I. (1993) "Cultivo de la alubia en León", *Agricultura: Revista agropecuaria y ganadera*, 734, pp. 770-773.

Filiz Doksöz, S. y Bozkurt, İ. A. (2022) "Biological control of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causing the olive knot disease with epiphytic and endophytic bacteria", *Journal of Plant Pathology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 104(1), pp. 65-78. doi:10.1007/s42161-021-00975-2.

Ghisalberti, E. L. y Sivasithamparam, K. (1991) "Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp", *Soil Biology and Biochemistry*, 23(11), pp. 1011-1020. doi:10.1016/0038-0717(91)90036-J.

Giddens, S. R., Feng, Y. y Mahanty, H. K. (2002) "Characterization of a novel phenazine antibiotic gene cluster in *Erwinia herbicola* Eh1087", *Molecular Microbiology*, 45(3), pp. 769-783. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03048.x.

- Girard, L., Höfte, M. y Mot, R. De (2020) "Lipopeptide families at the interface between pathogenic and beneficial *Pseudomonas*-plant interactions", *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd., 46(4), pp. 397-419. doi:10.1080/1040841X.2020.1794790.
- González Fernández, A. J. y Fernández Sanz, A. M. (2010) "La grasa de la judía, una enfermedad emergente en Asturias", *Tecnología Agroalimentaria*. SERIDA, pp. 12-13.
- González Fernández, A. J. y Landeras Rodríguez, E. (2004) "*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burk.) Gardanet al. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Van Hall", *Fichas de diagnóstico*, (232).
- Gross, H. y Loper, J. E. (2009) "Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp.", *Natural Product Reports*, 26(11), pp. 1408-1446. doi:10.1039/b817075b.
- Guzmán-Guzmán, P. y Santoyo, G. (2022) "Action mechanisms, biodiversity, and omics approaches in biocontrol and plant growth-promoting *Pseudomonas*: an updated review", *Biocontrol Science and Technology*. Taylor and Francis Ltd., 32(5), pp. 527-550. doi:10.1080/09583157.2022.2066630.
- Hashem, A., Tabassum, B. y Fathi Abd_Allah, E. (2019) "*Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress", *Saudi Journal of Biological Sciences*. King Saud University, 26(6), pp. 1291-1297. doi:10.1016/j.sjbs.2019.05.004.
- Hatvani, L., Homa, M., Chenthamara, K., Cai, F., Kocsubé, S., Atanasova, L., Mlinaric-Missoni, E., Manikandan, P., Revathi, R., Dóczy, I., Bogáts, G., Narendran, V., Büchner, R., Vagvölgyi, C., Druzhinina, I. S. y Kredics, L. (2019) "Agricultural systems as potential sources of emerging human mycoses caused by *Trichoderma*: A successful, common phylotype of *Trichoderma longibrachiatum* in the frontline", *FEMS Microbiology Letters*, 366(21), pp. 1-13. doi:10.1093/femsle/fnz246.
- Hill, R., Stark, C., Cummings, N., Elmer, P. y Hoyte, S. (2015) "Use of beneficial microorganisms and elicitors for control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit (*Actinidia* spp.)", *Acta Horticulturae*, 1095, pp. 137-144. doi:10.17660/actahortic.2015.1095.17.
- Johnson, K. B. y Stockwell, V. O. (1998) "Management of fire blight: A case study in Microbial Ecology", *Annu. Rev. Phytopathol*, 36, pp. 227-275. Disponible en: www.annualreviews.org.
- Johnson, K. B., Stockwell, V. O., McLaughlin, R. J., Sugar, D., Loper, J. E. y Roberts, R. G. (1993) "Effect of antagonistic bacteria on establishment of honey bee-dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control.", *Phytopathology*, 83(9), pp. 995-1002.
- Johnson, K. B., Stockwell, V. O., Sawyer, T. L. y Sugar, D. (2000) "Assessment of environmental factors influencing growth and spread of *Pantoea agglomerans* on and among blossoms of pear and apple", *Phytopathology*, 90(11), pp. 1285-1294.
- Junta de Castilla y León (1996) *Pliego de condiciones de la IGP «Judías de El Barco de Ávila»*.
- Junta de Castilla y León (2005) *Pliego de condiciones de la IGP «Alubia de la Bañeza-León»*.
- Khan, A. R., Mustafa, A., Hyder, S., Valipour, M., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., Yousuf, Z., Iqbal, R. y Daraz, U. (2022) "*Bacillus* spp. as bioagents: Uses and application for sustainable agriculture", *Biology*, 11(12), pp. 1-21. doi:10.3390/biology11121763.
- Kredics, L., Naeimi, S., Hatvani, L., Vágvölgyi, C., Cai, F., Druzhinina, I. S. y Manczinger, L. (2021) "'The Good, the Bad and the Ugly' in the shades of green: the genus *Trichoderma* in the spotlight", *Indian Phytopathology*. Springer India, 74(2), pp. 403-411. doi:10.1007/s42360-021-00352-0.
- Lastochkina, O., Aliniaefard, S., Garshina, D., Garipova, S., Pusenkova, L., Allagulova, C., Fedorova, K., Baymiev, A., Koryakov, I. y Sobhani, M. (2021) "Seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* strain-specifically improves growth of *Phaseolus vulgaris* plants under normal and salinity conditions and exerts anti-stress effect through induced lignin deposition in roots and decreased oxidative and osmotic damages", *Journal of Plant Physiology*. Elsevier GmbH, 263. doi:10.1016/J.JPLPH.2021.153462.

- MAPA (2021) *Anuario de estadística agroalimentaria*. Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- MAPA (2023) *Registro de Productos Fitosanitarios, Medios de defensa fitosanitaria*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro-productos/> (Accedido: 19 de junio de 2023).
- Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S. L., Ruocco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S., Soriente, I., Gigante, S., Turrà, D., Fogliano, V., Scala, F. y Lorito, M. (2006) "Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach", *Current Genetics*, 50(5), pp. 307-321. doi:10.1007/s00294-006-0091-0.
- Mayo, S., Cominelli, E., Sparvoli, F., González-López, O., Rodríguez-González, A., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2016) "Development of a qPCR Strategy to select bean genes involved in plant defense response and regulated by the *Trichoderma velutinum* – *Rhizoctonia solani* interaction", *Frontiers in Plant Science*, 7. doi:10.3389/fpls.2016.01109.
- Mayo, S., Gutiérrez, S., Malmierca, M. G., Lorenzana, A., Campelo, M. P., Hermosa, R. y Casquero, P. A. (2015) "Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes", *Frontiers in Plant Science*, 6. doi:10.3389/fpls.2015.00685.
- Mayo-Prieto, S., Campelo, M. P., Lorenzana, A., Rodríguez-González, A., Reinoso, B., Gutiérrez, S. y Casquero, P. A. (2020) "Antifungal activity and bean growth promotion of *Trichoderma* strains isolated from seed vs soil", *European Journal of Plant Pathology*, 158(4), pp. 817-828. doi:10.1007/s10658-020-02069-8.
- Ministerio de Agricultura, P. y A. (2021) *Guía de gestión integrada de plagas. Leguminosas: garbanzo, guisante, haba, judía lenteja, soja, veza, yero : (otras: alhova, almorta, altramuz, alverjón y titarro)*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2010) *Patógenos de plantas descritos en España*. 2.ª ed.
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (sin fecha) "Infografía Fitosanitarios".
- Mishra, P. K., Bisht, S. C., Jeevanandan, K., Kumar, S., Bisht, J. K. y Bhatt, J. C. (2014) "Synergistic effect of inoculating plant growth-promoting *Pseudomonas* spp. and *Rhizobium leguminosarum*-FB1 on growth and nutrient uptake of rajmash (*Phaseolus vulgaris* L.)", *Archives of Agronomy and Soil Science*, 60(6), pp. 799-815. doi:10.1080/03650340.2013.843773.
- Morán-Diez, M. E., Martínez de Alba, Á. E., Rubio, M. B., Hermosa, R. y Monte, E. (2021) "*Trichoderma* and the plant heritable priming responses", *Journal of Fungi*, 7(4). doi:10.3390/jof7040318.
- Mougou, I. y Boughalleb-M'hamdi, N. (2018) "Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affecting citrus orchards in Tunisia by using indigenous *Bacillus* spp. and garlic extract", *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28(1). doi:10.1186/s41938-018-0061-0.
- Mourouzidou, S., Ntinis, G. K., Tsaballa, A. y Monokrousos, N. (2023) "Introducing the power of plant growth promoting microorganisms in soilless systems: A promising alternative for sustainable agriculture", *Sustainability (Switzerland)*. MDPI, 15(7). doi:10.3390/su15075959.
- Moya-Elizondo, E. A., Quezada, T., Reyes Salinas, M. y Reyes Navarro, M. A. (2019) "Assessment of 3 Tac-I/Beta, an antimicrobial peptide source, in the control of *Pseudomonas* plant pathogens", *Acta Horticulturae*, 1243, pp. 33-38. doi:10.17660/ActaHortic.2019.1243.6.

- Müller, T. y Behrendt, U. (2021) "Exploiting the biocontrol potential of plant-associated pseudomonads – A step towards pesticide-free agriculture?", *Biological Control*. Academic Press Inc., 155. doi:10.1016/j.biocontrol.2021.104538.
- Murillo, J., Bardaji, L. y Führer, M. E. (2010) "La grasa de las judías, causada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicoda*", *Phytoma*, 223, pp. 1-5. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/330468372>.
- Nerek, E. y Sokołowska, B. (2022) "*Pseudomonas* spp. in biological plant protection and growth promotion", *AIMS Environmental Science*. American Institute of Mathematical Sciences, 9(4), pp. 493-504. doi:10.3934/environsci.2022029.
- Nikolić, I., Berić, T., Dimkić, I., Popović, T., Lozo, J., Fira, D. y Stanković, S. (2019) "Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10.7 and *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 and SS-38.4) strains", *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), pp. 165-176. doi:10.1111/jam.14070.
- Nowocień, K. y Sokołowska, B. (2022) "*Bacillus* spp. as a new direction in biocontrol and deodorization of organic fertilizers", *AIMS Environmental Science*, 9(2), pp. 95-105. doi:10.3934/environsci.2022007.
- Oni, F. E., Esmaeel, Q., Onyeka, J. T., Adeleke, R., Jacquard, C., Clement, C., Gross, H., Barka, E. A. y Höfte, M. (2022) "*Pseudomonas* lipopeptide-mediated biocontrol: chemotaxonomy and biological activity", *Molecules*. MDPI, 27(2). doi:10.3390/molecules27020372.
- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C. y Göker, M. (2020) "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), pp. 5607-5612. doi:10.1099/ijsem.0.004332.
- Pfordt, A., Schiwiek, S., Karlovsky, P. y von Tiedemann, A. (2020) "*Trichoderma Afroharzianum* ear rot—A new disease on maize in Europe", *Frontiers in Agronomy*. Frontiers Media S.A., 2. doi:10.3389/fagro.2020.547758.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M. y Bakker, P. A. H. M. (2014) "Induced systemic resistance by beneficial microbes", *Annual Review of Phytopathology*. Annual Reviews Inc., 52, pp. 347-375. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- Pileggi, M., Pileggi, S. A. V., Olchanheski, L. R., da Silva, P. A. G., Munoz Gonzalez, A. M., Koskinen, W. C., Barber, B. y Sadowsky, M. J. (2012) "Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil", *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 86(11), pp. 1127-1132. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.041.
- Poveda, J. y Eugui, D. (2022) "Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture", *Biological Control*. Elsevier Inc., 176(September), p. 105100. doi:10.1016/j.biocontrol.2022.105100.
- Pusey, P. L. (2002) "Biological Control Agents for Fire Blight of Apple Compared Under Conditions Limiting Natural Dispersal", *Plant Disease*, 86(6), pp. 639-644.
- Raio, A. y Puopolo, G. (2021) "*Pseudomonas chlororaphis* metabolites as biocontrol promoters of plant health and improved crop yield", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Science and Business Media B.V., 37(6). doi:10.1007/s11274-021-03063-w.
- Reinoso Sánchez, B., Boto Fidalgo, J. A., González Morala, M. y Campelo Rodríguez, M. P. (2022) *Varietades locales de alubia o judía grano (Phaseolus vulgaris L.) de la Provincia de León*. Segunda. León: Universidad de León.
- Reinoso Sánchez, B. y Valenciano Montenegro, J. B. (1998) "Problemas fitosanitario de la alubia en León", *Agricultura: Revista agropecuaria y ganadera*, 792, pp. 568-572.

- Rico, A., López, R., Asensio, C., Teresa Aizpún, M., Carmen Asensio-S-Manzanera, M. y Murillo, J. (2003) "Nontoxicogenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* are a main cause of halo blight of beans in Spain and escape current detection methods", *Bacteriology*, 93(12), p. 1553.
- Robaina, B., Fontana Capalbo, D. M. y Dos Santo Nascimento, R. (2009) "Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner y actividad biológica hacia *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)", *Fitosanidad*, 13(3), pp. 187-192.
- Rodríguez-González, A., Carro-Huerga, G., Mayo-Prieto, S., Lorenzana, A., Gutiérrez, S., Peláez, H. J. y Casquero, P. A. (2018) "Investigations of *Trichoderma* spp. and *Beauveria bassiana* as biological control agent for *Xylotrechus arvicola*, a major insect pest in Spanish vineyards", *Journal of Economic Entomology*, 111(6), pp. 2585-2591. doi:10.1093/jee/toy256.
- Rodríguez-González, Á., Casquero, P. A., Suárez-Villanueva, V., Carro-Huerga, G., Álvarez-García, S., Mayo-Prieto, S., Lorenzana, A., Cardoza, R. E. y Gutiérrez, S. (2018) "Effect of trichodiene production by *Trichoderma harzianum* on *Acanthoscelides obtectus*", *Journal of Stored Products Research*, 77, pp. 231-239. doi:10.1016/j.jspr.2018.05.001.
- Rodríguez-González, Á., Frontela, A., Lorenzana, A., Henrique da Silva, P., Mayo, S., González-López, Ó., Gutiérrez, S. y Casquero, P. (2016) "Insecticidal activity of *Trichoderma harzianum* against *Xylotrechus arvicola* and *Acanthoscelides obtectus* immature stages", *Planta Medica*, 81(S 01), pp. S1-S381. doi:10.1055/s-0036-1596808.
- Romero, J. P. (1962) "Enfermedades y plagas de la judía", *Hojas Divulgadoras*. Madrid: Ministerio de Agricultura. Dirección General de Coordinación, Crédito y Capacitación Agraria, pp. 1-28.
- Sansinenea, E. (2019) "*Bacillus* spp.: As plant growth-promoting bacteria", en *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms. Discovery and Applications*, pp. 225-237.
- Schnyder, A., Eberl, L. y Agnoli, K. (2022) "Investigating the biocontrol potential of the natural microbiota of the apple blossom", *Microorganisms*. MDPI, 10(12). doi:10.3390/microorganisms10122480.
- Segarra, G., Sant, D., Trillas, M. I., Casanova, E., Noguera, R., Castillo, S., Borrero, C. y Avilés, M. (2013) "Efficacy of the Microbial Control Agent *Trichoderma asperellum* Strain T34 Amended to Different Growth Media against Soil and Plant leaf Pathogens", *Acta Horticulturae*, 1013, pp. 515-520. doi:10.17660/ActaHortic.2013.1013.64.
- Teoh, M. C., Furusawa, G. y Veera Singham, G. (2021) "Multifaceted interactions between the pseudomonads and insects: mechanisms and prospects", *Archives of Microbiology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 203(5), pp. 1891-1915. doi:10.1007/s00203-021-02230-9.
- Vanneste, J. L., Cornish, D. A., Yu, J. y Hortresearch, M. D. V. (2002) "The peptide antibiotic produced by *Pantoea agglomerans* Eh252 is a microcin", *Acta Hort*, 590, pp. 285-290.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. y Lorito, M. (2008) "*Trichoderma*-plant-pathogen interactions", *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), pp. 1-10. doi:10.1016/j.soilbio.2007.07.002.
- Volksch, B., Ullrich, M. y Fritsche, W. (1993) "Occurrence of antimicrobial activities of bacteria from soybean leaf spots", *Journal of Basic Microbiology*, 33(5), pp. 349-355.
- Walterson, A. M. y Stavrinos, J. (2015) "*Pantoea*: Insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae", *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press, pp. 968-984. doi:10.1093/femsre/fuv027.
- Wright, S. A. I. y Beer, S. V (2002) "Genes for Biosynthesis of Pantocin A and B by *Pantoea agglomerans* Eh318", *Acta Hort*, 590, pp. 237-241.

- Yadegari, M., Rahmani, H. A., Noormohammadi, G. y Ayneband, A. (2008) "Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(15), pp. 1935-1939. doi:10.3923/PJBS.2008.1935.1939.
- Yagüe Martínez de Tejada, Á. (2008) "Evolución histórica de los productos fitosanitarios. 20 años de control fitosanitario.", *Phytoma*, 197.
- Yang, C., Feng, Z., Wang, Y., Jin, M., Li, T. y Zhou, J. J. (2021) "Identification and colonization dynamics of an antagonistic endophytic bacterium 262XY2' against *Pseudomonas syringae* causing tomato leaf spot disease", *European Journal of Plant Pathology*. *European Journal of Plant Pathology*, 161(1), pp. 233-245. doi:10.1007/s10658-021-02318-4.
- Yang, W. T., Yi, Y. J. y Xia, B. (2023) "Unveiling the duality of *Pantoea dispersa*: A mini review", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.scitotenv.2023.162320.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y. y Chet, I. (2003) "Concomitant induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins", *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), pp. 7343-7353. doi:10.1128/AEM.69.12.7343-7353.2003.
- Zhang, S., Fu, Y., Mersha, Z. y Pernezny, K. (2017) "Assessment of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the pathogen of halo blight on snap bean", *Crop Protection*. Elsevier Ltd, 98, pp. 8-15. doi:10.1016/j.cropro.2017.03.009.
- Zhang, W., Han, D. Y., Dick, W. A., Davis, K. R. y Hoitink, H. A. J. (1998) "Compost and compost water extract-Induced Systemic Acquired Resistance in cucumber and arabidopsis", *Phytopathology*, 88(5), pp. 450-455.