

## VINAZAS Y HONGOS DEL SUELO

Vicente N., Milagrosa Santos, Nelly Vicente, Fernando Diáñez, Miguel de Cara, Julio C. Tello

Departamento de Producción Vegetal, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería, Carretera Sacramento s/n, La Cañada de San Urbano. 04120 Almería, (España). Tlf: 950015511/27, Fax: 950015939. E-mail: msantos@ual.es

### Resumen

El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto biocida de tres subproductos agroindustriales, concretamente de la vinaza de remolacha, la vinaza de caña de azúcar y la vinaza de vino. Se realizaron dos estudios, el primero se centró en estudiar *in vitro* la acción de los tres subproductos agroindustriales analizando su comportamiento en diluciones a las dosis iniciales del 1%, 3% y 5% frente a seis hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* raza 0 y 1, *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium aphanidermatum* y *Phytophthora parasitica*. Posteriormente, se estudió la capacidad antagonista de las disoluciones ensayadas *in vitro*, sobre suelos, estudiando la incidencia de los subproductos mencionados sobre las poblaciones fusáricas presentes en dichos suelos.

Los resultados obtenidos para los ensayos realizados *in vitro* determinan que la vinaza de vino es la que presenta una capacidad de supresión del crecimiento fúngico del 100% a concentraciones no muy elevadas, entre el 5% y 7% para *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* raza 0 y 1, *S. sclerotiorum*, *P. aphanidermatum* y *P. parasitica* y al 10-15% para *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*. Por el contrario, la vinaza de caña de azúcar produce un incremento a altas concentraciones y la vinaza de remolacha presenta efecto supresor del crecimiento fúngico aproximadamente del 100% sólo para algunos de los fitopatógenos ensayados: *S. sclerotiorum* (15%), *P. aphanidermatum* (7%), *P. parasitica* (15%) y *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (15%).

En las muestras de suelo analizadas ninguno de los tres extractos de vinaza consigue disminuir la microbiota fusárica, produciendo un incremento en las tres muestras ensayadas, lo que podría llevar implícito una mejora en la calidad de los suelos al producirse un posible incremento en la microbiota bacteriana y fúngica de los mismos.

**Palabras claves:** Subproductos agroindustriales, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Phytophthora* *Pythium*, control biológico.

### Summary

#### Vinasses and soil-borne fungi

The purpose of this research was to study the biocidal effect of three agroindustrial subproducts, concretely sugar beet, sugar cane and wine vinasse. Two tests were carried out. The first centred on studying the action of the three agroindustrial subproducts *in vitro*. In dilutions at initial doses of 1%, 3% and 5%, their performance against six phytopathogenic fungi was analyzed: *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 0 and 1, *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium aphanidermatum* and *Phytophthora parasitica*. Next, the antagonistic capacity of the solutions assayed *in vitro* was tested in soil, studying the incidence of the subproducts on the *Fusarium* populations in these soils.

Results from *in vitro* testing determined that wine vinasse is what shows a 100% capacity to suppress fungal growth with concentrations that are not very high, between 5% and 7% for *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 0 and 1, *S. sclerotiorum*, *P. aphanidermatum* and *P. parasitica* and 10-15% for *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*. On the other hand, sugar cane vinasse produced an increase at high concentrations and sugar beet vinasse showed an approximate 100% suppressor effect on fungal growth for only some of the phytopathogens tested: *S. sclerotiorum* (15%), *P. aphanidermatum* (7%), *P. parasitica* (15%) and *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (15%).

In the soil samples analyzed none of the three vinasse extracts decreased fusaric microbiota, producing an increase in the three samples tested. This would implicitly convey an improvement in soil quality by producing a potential increase in bacterial and fungal microbiota.

Therefore the continuity of this research is necessary, carrying out field experiments so potential lower concentrations can be determined that generate disease suppression in more complex systems.

**Keywords:** Agroindustrial subproducts, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Phytophthora* *Pythium*, biological control.

## Introducción

Uno de los mayores retos de los últimos años al que se están enfrentando los investigadores y técnicos en agricultura intensiva es el de encontrar alternativas al bromuro de metilo (BM) y en general a los pesticidas, por sus efectos negativos para el ambiente y la salud de los ciudadanos. Por otro lado el incremento en la producción de residuos de la sociedad actual es un hecho ineludible, así las condiciones socioeconómicas actuales y previsibles exigen una gestión de los residuos bastante diferente de la efectuada en las décadas pasadas siendo las distintas alternativas para paliar los efectos de estos residuos una preocupación en los distintos niveles de la población ya que únicamente atribuyendo un valor a estos residuos dejarán de serlo pudiendo pasar quizás al concepto de recurso o subproducto.

Cabe destacar, por tanto, la necesidad e importancia que presentan las investigaciones sobre el efecto biocida de subproductos agroindustriales y ganaderos que sirvan de base para el registro de biopesticidas, que serían de gran utilidad, al tiempo que permitiría cumplir con compromisos internacionales sobre el medio ambiente y la salud como son el Protocolo de Montreal en el caso del bromuro de metilo y el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes.

Las investigaciones previas han puesto de manifiesto la eficacia de la biofumigación en el control de hongos y nematodos patógenos de plantas, comprobando que los distintos subproductos empleados para este fin poseen una eficacia similar a la de los fumigantes convencionales, incrementando las poblaciones de organismos saprófagos y la biomasa de las plantas cultivadas sobre los suelos biofumigados, si bien su eficacia depende de la dosis y de los protocolos de aplicación. Por estas razones, sería necesaria la optimización de las técnicas de aplicación en campo de estos subproductos, para utilizarlos como una alternativa en el control de patógenos de vegetales, así como evaluar la medida en que pueden actuar como mejoradores orgánicos, al potenciar las propiedades físicas y químicas de los suelos. Con ello, se lograría incrementar la rentabilidad de los cultivos, evitando el impacto ambiental de los subproductos agroindustriales y ganaderos cuando son gestionados de modo inadecuado.

Así, el desarrollo de procedimientos para el aprovechamiento y transformación de los subproductos agroindustriales pueden llegar a la implantación de prácticas alternativas para la protección de cultivos, res-

petuosas con el medio ambiente, y compatibles con los requerimientos de la agricultura ecológica.

En este trabajo se evalúa el efecto biocida de tres subproductos agroindustriales: vinaza de remolacha, vinaza de caña de azúcar, y vinaza de vino; centrándose en dos aspectos, por un lado se estudia *in vitro* la acción de los tres subproductos agroindustriales analizando su comportamiento en disoluciones, a las dosis iniciales del 1%, 3% y 5% frente a seis hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* raza 0, *F. oxysporum* f.sp. *melonis* raza 1, *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, pretendiendo establecer, en función de los resultados obtenidos, las dosis óptimas para el control de dichos hongos. Asimismo, se estudió la incidencia de los subproductos mencionados sobre las poblaciones fusáricas de diferentes suelos.

## Material y métodos

### Evaluación de la inhibición del crecimiento fúngico por la acción de las vinazas

Para el crecimiento de las distintas especies fúngicas, los aislados fueron mantenidos en placas de Petri de 9 cm. de diámetro en medio PDA. El mantenimiento de los distintos hongos se realiza con siembras semanales para *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* raza 0 (Fom), *F. oxysporum* f.sp. *melonis* raza 1 (Fom 1), *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (FORC), y cada cuatro días aproximadamente para *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Las unidades de inóculo para los ensayos se obtuvieron de las placas de mantenimiento, componiéndose de discos de 5 mm de diámetro sacados, con ayuda de un sacabocados, de la periferia de colonias de unos 6 cm de diámetro, en crecimiento activo. Por tanto, el inóculo está compuesto básicamente de extremos miceliares en crecimiento y no de conidias y otros tipos de propágulos latentes que requerirían un periodo de incubación antes de su germinación.

Para evaluar el efecto supresor del crecimiento fúngico de las vinazas se realizaron ensayos *in vitro* con diluciones de vinaza de remolacha, vinaza de caña de azúcar y vinaza de vino al 1%, 3%, y 5% (y posteriormente al 7%, 10% y 15%) en PDA analizando su efecto sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos: *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* raza 1, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora parasitica*.

Los discos con los hongos se colocaron en el centro de la placa de Petri. Las placas se incubaron en la estufa y en oscuridad a 25-26°C durante una semana, con excepción de *Pythium aphanidermatum* y *Sclerotinia sclerotiorum* que se incubó tres días. Se realizaron cinco repeticiones y los resultados se compararon con testigos sin aplicación de vinazas. El análisis del crecimiento se realizó mediante la medición del diámetro de la cepa en el medio, para lo cual se tomaron dos medidas (dos diámetros perpendiculares), empleando finalmente como dato representativo la media de ambos valores. Finalmente el análisis estadístico de los resultados obtenidos para evaluar el efecto de la concentración de los extractos sobre la eficacia de la supresión fúngica se realizó con el programa STATGRAPHICS 5.1 (S.G.S., 2001).

### **Estudio de la capacidad antagonista de las disoluciones *in vitro* sobre suelos**

Se estudió y cuantificó la microbiota fusárica de tres muestras de suelo, procedentes de un cultivo de judía con origen en Asturias, estudiando el efecto de la aplicación de las vinazas (vinaza de remolacha, vinaza de caña de azúcar y vinaza de vino al 1%, 3%, 5%, 7%, 10% y 15%) sobre las poblaciones fusáricas presentes en dichas muestras; para ello se procedió al análisis de la microbiota fusárica total antes y después de la aplicación del subproducto (Tello *et al.* 1991).

Este análisis se realizó por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias de *Fusarium* spp., expresándose en UFC/g m.s. Se empleó la técnica de la dilución del suelo directamente en placa (soil-plate), descrita por Warcup (1950), que incorpora la tierra o sustrato, previamente triturado y pesado, directamente al medio de cultivo en estado de fusión próximo a la temperatura de solidificación. El medio de cultivo empleado para los análisis fue el ideado por Komada (1975) modificado en la composición de la solución de antibióticos, según Tello *et al.* (1991). Se seleccionó este medio por su elevada selectividad para las especies de *Fusarium* y la relativa sencillez con que permite diferenciar algunas de ellas (*F. oxysporum* (Schlecht) Snyder y Hans., *F. solani* (Mart.) (Appel y Wollenw.) Snyder y Hans., *F. roseum* (Link) Snyder y Hans. y *F. moniliforme* (Sheldon) Snyder y Hans.) en base a la pigmentación, aspecto y velocidad de crecimiento de sus colonias.

La metodología de análisis se ajusta a la descrita por Tello *et al.*, (1991), basada en la elaborada por Rouxel & Bouhot (1971). Las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente para su estabilización, durante un tiempo variable (entre 3 y 7 días) según la humedad de la muestra. Una vez secadas, se tomó una alícuota que se molió en mortero de porcelana y se tamizó por una luz de 200 µm. Por cada muestra a analizar se prepararon cuatro frascos de vidrio con 20 g de suelo, secado a temperatura ambiente, con un tamaño máximo de

partícula de 200 µm, en cada uno de ellos. Cada frasco se tomó como una repetición, y se pesó, con una precisión de 0,001 g, antes y después del análisis. De esta forma se determinó por diferencia el peso de sustrato analizado en cada repetición. En cada placa de Petri (9 cm. de diámetro) se añadieron, con una micro-espátula, una pequeña cantidad de suelo, que se homogeneizó con 10 ml de medio de cultivo Komada (temperatura de 40-42°C). Por cada frasco de vidrio o repetición se prepararon 4 placas, lo que suma un total de 16 de placas de análisis. Las placas de Petri se incubaron a temperatura ambiente durante un periodo de 5-10 días. Para la determinación de la microbiota fusárica total, se realizó un recuento después de los cuatro primeros días, punteándolas por detrás de la placa de Petri, tres o cuatro días más tarde se realizó una última anotación.

El procedimiento seguido para el análisis de las muestras tras la aplicación del producto es el mismo que el descrito anteriormente, la única diferencia radica en que una vez preparadas las muestras se le añaden a cada una de ellas 10 ml de las diluciones preparadas previamente con agua esterilizada y vinaza a las concentraciones correspondientes. Tras dicha adición las muestras de suelo se dejaron secar a Tª ambiente el tiempo necesario, continuando posteriormente con los pasos descritos. Tras el recuento y caracterización de las unidades formadoras de colonias de *Fusarium* spp. (UFC/g m.s.) se estableció un análisis comparativo de la microbiota fusárica total antes y después de la aplicación del subproducto (Tello *et al.* 1991).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para evaluar el efecto de la concentración de los extractos se realizó con el programa STATGRAPHICS 5.1 (S.G.S., 2001).

## **Resultados**

### **Evaluación de la inhibición del crecimiento fúngico por la acción de las vinazas**

El ensayo realizado tenía por objetivo determinar el efecto inhibitorio *in vitro* sobre el desarrollo fúngico, de los vertidos de vinaza frente a los seis patógenos: *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom), f.sp. *melonis* raza 1, *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Las dosis inicialmente empleadas fueron 1%, 3% y 5%, con la idea inicial de pasar a diluciones más bajas y establecer las dosis óptimas para el control de hongos. Dado que una vez finalizado el ensayo con estas dosis no se observaron diferencias significativas visuales, se aumentaron las dosis al 7%, 10% y 15%.

La Figura 1, muestra el porcentaje de inhibición de la vinaza de remolacha frente a los distintos hongos. Se puede observar como la vinaza de remolacha, a concentraciones más o menos elevadas, consigue sólo para el caso de algunos de los hongos, una inhibición del 100%; en el caso

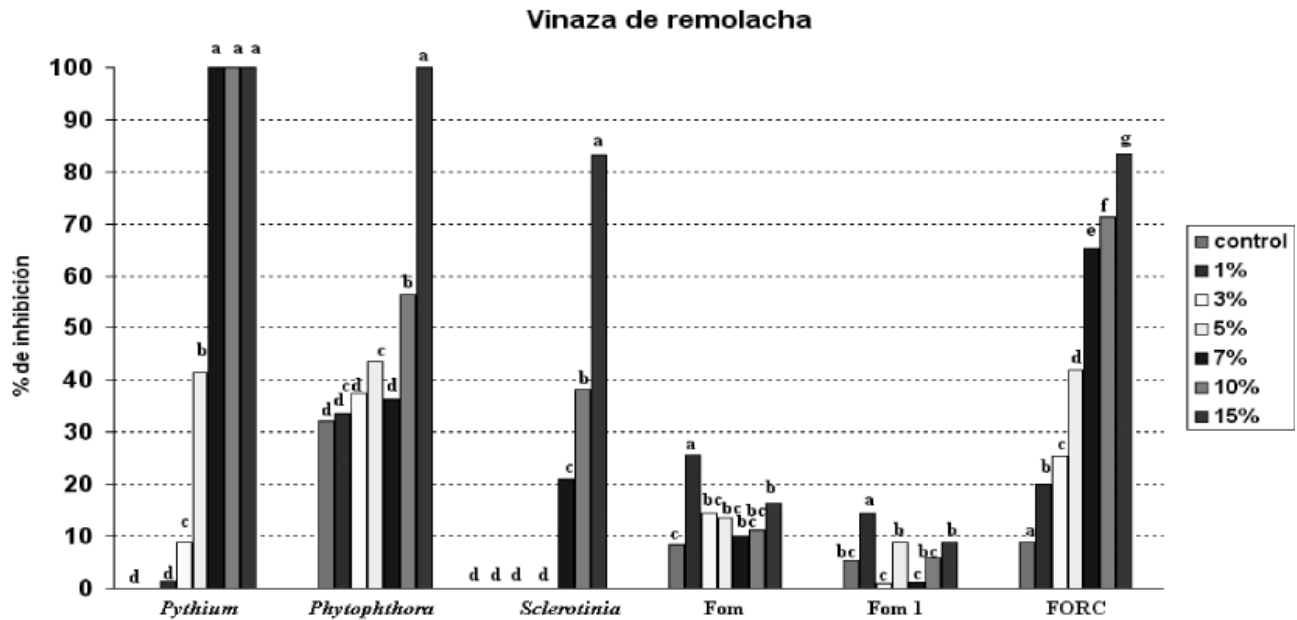


Figura 1. Efecto de la vinaza de remolacha sobre los distintos hongos fitopatógenos

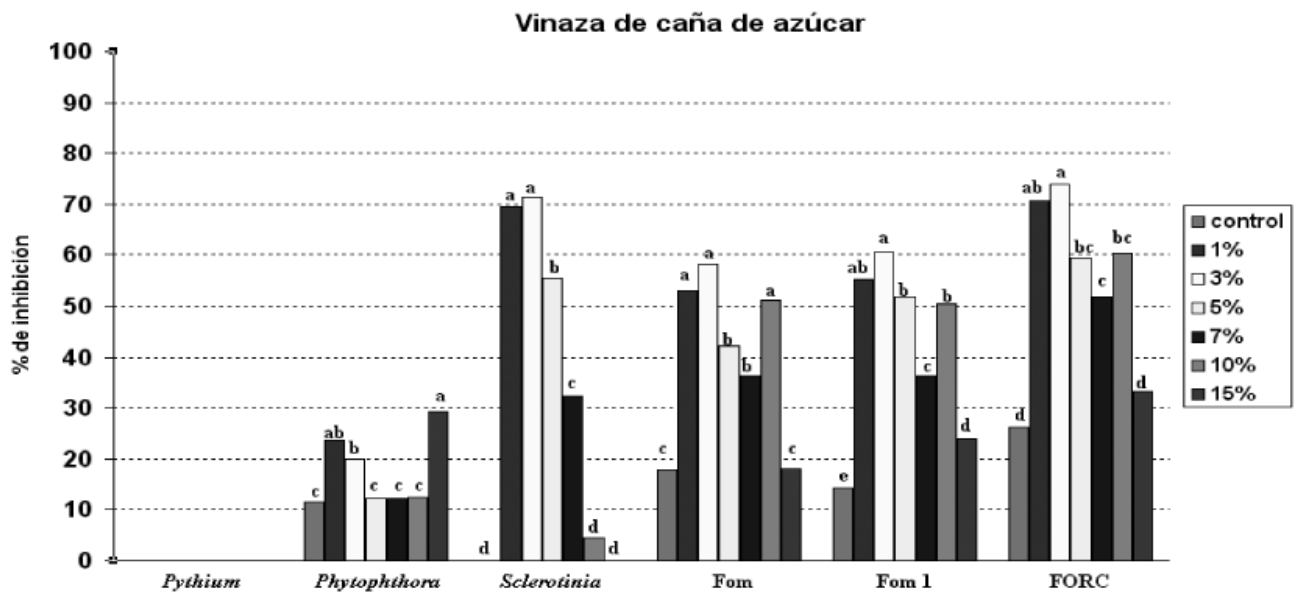


Figura 2. Efecto de la vinaza de caña de azúcar sobre los distintos hongos fitopatógenos

de *Pythium* a partir del 7% y, para el caso de *Phytophthora*, *Sclerotinia* y FORC es necesario una concentración del 15%, no mostrando una inhibición del 100% a ninguna de las concentraciones ensayadas para Fom y Fom1.

A pesar de que la inhibición máxima se produce a elevadas concentraciones, a menores concentraciones ya existen diferencias significativas con respecto al crecimiento del testigo, al 3% para el caso de *Pythium* o *Phytophthora*, al 7% para el caso de *Sclerotinia* e incluso al 1% para el caso de FORC.

En la Figura 2, se muestra como la vinaza de caña de azúcar, no consigue inhibir el desarrollo micelial total para ninguno de los hongos fitopatógenos ensayados llegando incluso a no presentar efecto alguno sobre el crecimiento como es el caso de *Pythium* en el que para

todas las concentraciones ensayadas el crecimiento del hongo fue máximo.

La vinaza de vino es sin lugar a dudas como puede observarse en la Figura 3, la que mejores resultados obtuvo en cuanto a inhibición, consiguiendo alcanzar una inhibición aproximada del 100% para todos los hongos ensayados. En el caso de *Pythium* y *Phytophthora* a partir del 5% ya la inhibición es del 100% siendo ésta la mínima concentración que presenta diferencias significativas con respecto al testigo; para *Sclerotinia* y FORC las concentraciones del 7% y 10% producen una inhibición casi total, siendo la concentración del 15% la que consigue la inhibición total del crecimiento del hongo. Para Fom y Fom 1, al 7% se obtienen los mejores resultados a concentración del 3% y diferencias significativas con respecto al control.

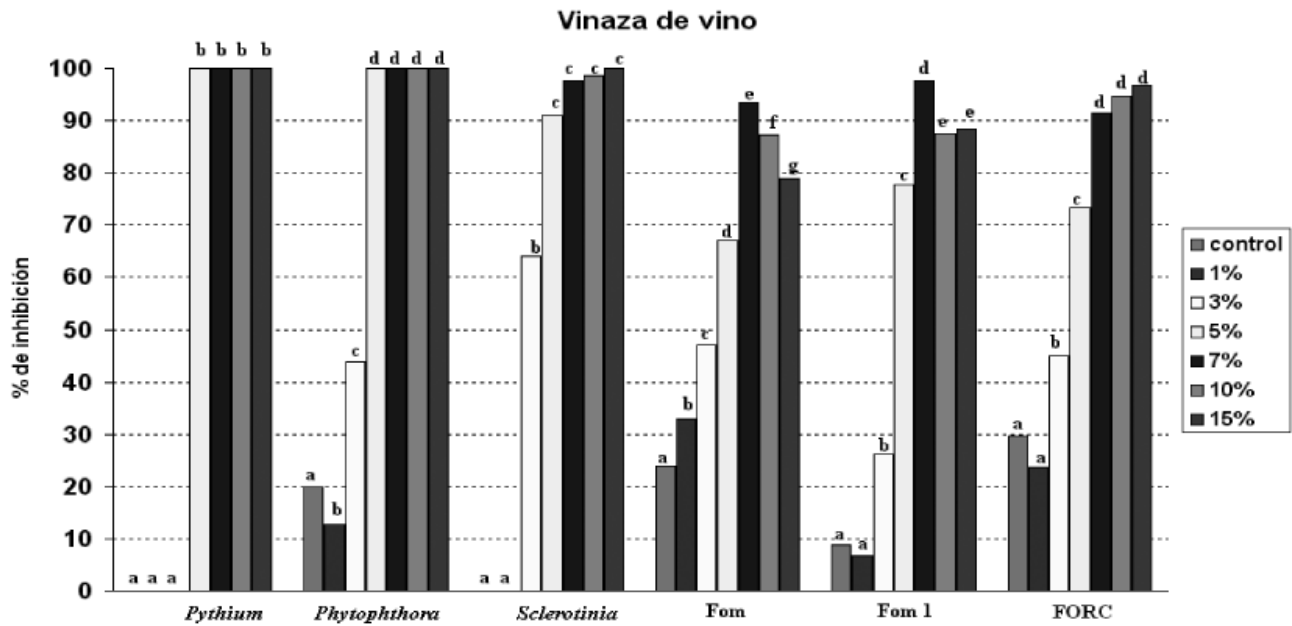


Figura 3. Efecto de la vinaza de vino sobre los distintos hongos fitopatógenos

Tabla 1. Concentración de vinaza que produce un 100% de inhibición de crecimiento micelial *in vitro*.

	Extracto de vinaza de remolacha	Extracto de vinaza de vino	Extracto de vinaza de caña de azúcar
<i>P. aphanidermatum</i>	7%	5%	-
<i>P. parasitica</i>	15%	5%	-
<i>S. sclerotiorum</i>	15%	5%	-
Fom	-	7%	-
Fom1	-	7%	-
FORC	15%	10-15%	-

La Tabla 1, expresa, a modo de resumen, las concentraciones de los diferentes extractos que producen una supresión del crecimiento fúngico aproximadamente del 100% para los seis hongos ensayados y podemos observar como la aplicación de vinaza de caña de azúcar no consigue la máxima inhibición del crecimiento fúngico para todos los hongos fitopatógenos ensayados.

No existe bibliografía para comparar los resultados obtenidos con otros autores, dado que en la literatura los escasos artículos hacen referencia al uso de los vertidos de vinazas como fertilizantes o mejoradores de las propiedades físico-químicas del suelo entre otras.

En trabajos realizados por el equipo del Dr. Bello (Bello 1997, Bello & Tello 1998), se ha estudiado la acción de subproductos agroindustriales y ganaderos en la protección de cultivos, evaluando su eficacia en el control de nematodos patógenos de plantas y comprobando que tienen una eficacia similar a los nematicidas convencionales en el control del nematodo formador de nódulos (*M. incognita*), incrementando la población de nematodos saprófagos. Así, para el caso de los extractos de vinaza basta una concentración del 0,2% para conseguir la supresión de *M. incognita*. También aplicaciones de vinazas al 2% tanto solas como combinadas con estiércol y

cubiertas con plástico resultan altamente eficaces en el control de *X. index*. Una eficacia similar se observó en la aplicación de vinazas sin plástico más materia orgánica, no resultando eficaz después de cinco meses cuando se emplean solas sin plástico, (Bello, com. personal).

Por otra parte, los resultados obtenidos en el caso del extracto de vinaza de vino, parecen concordar con resultados obtenidos por Diáñez *et al.* (2007) en el caso del compost de orujo de vid, donde detecta supresividad frente a nueve hongos fitopatógenos tras la utilización del compost, en concreto en la evaluación *in vitro* de los téis aireados del compost se obtuvo una elevada inhibición del crecimiento micelial (siempre superior al 80% con todas las condiciones ensayadas) cuando se emplearon los téis filtrados.

**Evaluación de la capacidad antagonista de las disoluciones ensayadas *in vitro* sobre suelos**

Una vez realizado el análisis anterior, se procedió a estudiar y cuantificar la microbiota fusárica de tres muestras de suelo, suelos de pastizales transformados en agrícolas procedentes de Asturias y sin presencia de patógenesis alguna. En dichos suelos, no se describieron

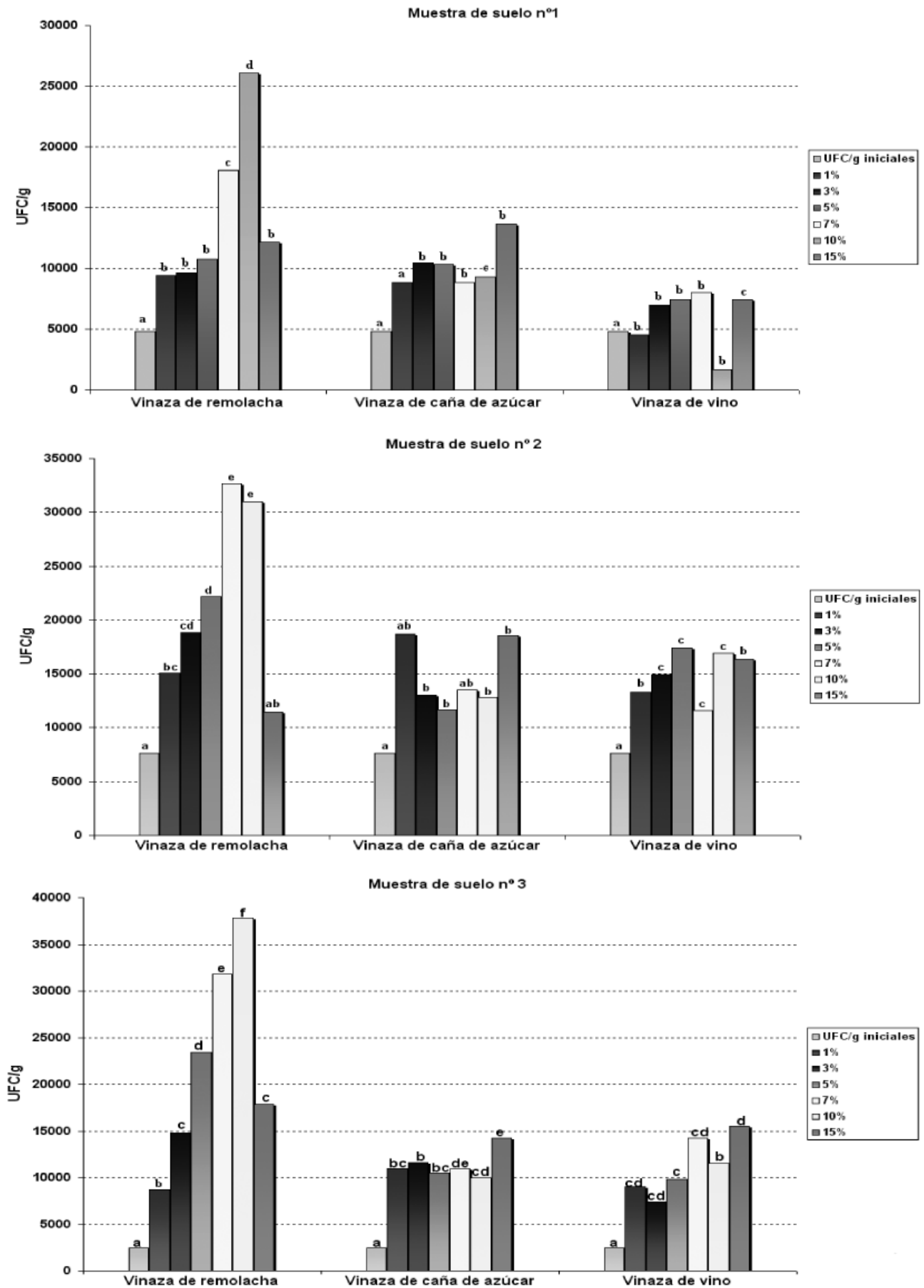


Figura 4. Efecto de las distintas concentraciones de vinaza sobre la muestra de suelo 1

enfermedades y tampoco existieron variaciones en sus poblaciones antes y después de un proceso de biosolarización. Se estudió, *in vitro*, la capacidad antagonista de las diluciones ensayadas anteriormente frente a las poblaciones fusáricas de dichas muestras. Este análisis se realizó por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias de *Fusarium* spp., expresándose en UFC/g m.s. (Figura 4) frente a la concentración para un nivel de confianza del 95%.

Como se puede observar, los tres extractos de vinaza dan lugar a un incremento de la microbiota fusárica de las muestras, produciendo un incremento máximo de dos a seis veces más en el caso de las muestras de suelo nº 1 y 2, y de hasta 15 veces más en el caso de la muestra nº 3. Los datos obtenidos son difíciles de contrastar con otros autores debido a que los escasos artículos existentes en la literatura hacen referencia como ya se ha mencionado anteriormente a la actividad de la vinaza como fertilizante o mejorador de las propiedades físico-químicas del suelo entre otras.

No obstante, Camargo (1960, en García & Rojas 2006) encontró que la población de bacterias en un suelo incubado con vinaza, creció rápidamente de la primera a la cuarta semana de incubación aún con una dosis tan baja como  $150 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$  de vinaza diluida (concentración de sólidos de 10% p/p) existiendo un aumento poblacional del 25,3% con respecto al suelo sin vinaza. Los azúcares rápidamente utilizables, como pentosas, son fácilmente descompuestos por los microorganismos del suelo durante los procesos de descomposición de materia orgánica, al tiempo que la nitrificación y desnitrificación se ven alterados, situación que se puede corregir mediante la adición de vinaza. Por ejemplo, la fijación de nitrógeno requiere teóricamente 1,7 g de carbono por cada gramo de nitrógeno fijado, así que si el suelo tiene bajos contenidos de carbono, la adición de vinaza puede mejorar este proceso. O sea, que la vinaza se puede utilizar como promotor de la actividad microbiana en la descomposición de residuos en campo. Adicional a esto, varios investigadores le han atribuido a la materia orgánica parte de la responsabilidad por mejorar la estructura física del suelo al aumentar la población y la actividad microbiana e incrementando la infiltración del agua, atribuyendo estos efectos a los productos y secreciones de los microorganismos al descomponer la materia orgánica, los cuales son aptos para unir las partículas del suelo entre sí (García 2005).

Relacionar el hecho concreto de que la vinaza de vino consiga una supresión del crecimiento fúngico en los ensayos realizados *in vitro* para *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* raza 0, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* raza 1 y *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* y como acabamos de ver aumente la microbiota fusárica de las muestras de suelo es un hecho difícil de explicar y contrastar debido a la escasa bibliografía. Ante este hecho hay que destacar las diferencias existentes entre

un caso y otro, ya que las condiciones de cada ensayo son diferentes, no siendo fácil de correlacionar los resultados de un análisis *in vitro* con un análisis de suelo, principalmente debido a que en el suelo existen una gran diversidad de microorganismos cuyo desarrollo puede verse favorecido o desfavorecido por la adición del extracto durante el periodo de incubación existente estableciendo relaciones de antagonismo o simbiosis entre ellos. Además cuando hablamos de Fom, Fom1 y FORC estamos hablando de hongos fitopatógenos y en el análisis de suelo únicamente se analiza la microbiota fusárica en general sin llegar a nivel de especie, existiendo la posibilidad de que el incremento de la microbiota fusárica inicial de las muestras de suelo se deba a un incremento de especies de *Fusarium* saprófitas y no fitopatógenas, por lo que sería adecuado contrastar los resultados obtenidos mediante inoculaciones en plantas observando si realmente los extractos de vinaza generan un incremento de la patogénesis.

## Referencias

- Bello A. 1997. La retirada del bromuro de metilo como fumigante. Consecuencias para la agricultura española. *Vida rural* 45: 70-72.
- Bello A, Tello JC. 1998. El bromuro de metilo se suprime como fumigante del suelo. *Phytoma España* 101: 10-21.
- Diáñez F, Santos M, Tello JC. 2007. Suppressive Effects of Grape Marc compost on Phytopathogenic Oomycetes. *Archives of phytopathology and plant protection* 40(1): 1-19.
- García O, Rojas C. 2006. Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de Acuerdo con su Modo de Acción en los Suelos. *Técnica* 17: 3-13.
- García A. 2005. Hacia la desmitificación de la Materia Orgánica. *Memorias Primera Jornada Científica Académica Internacional y II Festival Agropecuario y Agroindustrial*. Universidad de Pamplona, Santander. Noviembre 1-4/2005
- Komada H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soils. *Review of plant protection*. Res. 8: 114-125.
- Rouxel F, Bouhot D. 1971. Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. IV. Nouvelles mises au point concernant l'analyse sélective et quantitative des *Fusarium oxysporum* et *Fusarium salani* dans le sol. *Annals of Phytopathology* 3 (2): 171-188.
- Tello JC, Vares F, Lacasa A. 1991. Análisis de muestras. *El Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nemátodos fitopatógenos*. M.A.P.A. Madrid, pp. 39-72 pp.
- Warcup JH. 1950. The soil plate method for isolating fungi from soil. *Nature* 166: 117-118.