

CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES

Bacterias autóctonas de acebuches contra la Verticilosis del olivo

Miguel Montes Borrego

Sergio Aranda Ocampo

Blanca B. Landa

Laboratorio de "Biología y Ecología de la microbiota del suelo"

Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Alameda del Obispo s/n, Córdoba

La verticilosis del olivo se ha consolidado como la enfermedad más preocupante para este cultivo en España por su amplia distribución, intensidad y gravedad de las pérdidas que ocasiona (Landa *et al.*, 2009). Estas circunstancias han motivado el desarrollo de numerosas investigaciones que han puesto de manifiesto que esta enfermedad es de naturaleza compleja, lo cual dificulta de forma notable que su control pueda ser alcanzado mediante una única medida. Actualmente se acepta que es necesaria la integración de diferentes medidas para el control de la verticilosis del olivo. Este artículo presenta aspectos novedosos sobre el desarrollo de una de las estrategias de control más respetuosas con el medio ambiente como es el uso de agentes de control biológico.

El olivo ha sido culturalmente y económicamente el principal cultivo oleaginoso de la Cuenca Mediterránea. España es el mayor productor de aceite de oliva en el mundo, y Andalucía con aproximadamente 1,5 millones ha de olivo constituye la principal área de cultivo del país con el 62% de la superficie total de olivar. Esta superficie tiene un dominio de grandes extensiones de montaña y colinas características del paisaje andaluz ocupando hasta

el 17% de la superficie de la región. Además, en este área, existe una excepcional presencia de bosques de olivos silvestres que representan un componente predominante y distintivo de la flora Mediterránea (Rubio de Casas *et al.*, 2002).

En la Cuenca Mediterránea, la producción del cultivo del olivo puede ser amenazada por diferentes enfermedades, principalmente de etiología fúngica. En este contexto, la Verticilosis, causada por el hongo patógeno

del suelo *Verticillium dahliae* Kleb., es considerada una de las enfermedades más importantes y serias que afectan el cultivo del olivo en todo el mundo.

SÍNTOMAS DE LA VERTICILOSIS DEL OLIVO

En base a su virulencia diferencial en algodón y olivo, *V. dahliae* puede ser clasificado en dos variantes patogénicas: patotipo defoliante y no defoliante, (Jiménez-Díaz *et al.*, 2010; Navas-Cortés *et al.*, 2008).

Las infecciones causadas por el patotipo defoliante pueden ser letales para las plantas de olivo y actualmente son la causa de severos ataques que pueden originar dramáticas pérdidas en el rendimiento de plantaciones comerciales de olivo constituyendo hasta el momento la principal amenaza para el olivar en el sur de España (Jiménez-Díaz *et*

al., 1998; Navas-Cortés *et al.*, 2008).

Los síntomas característicos observados en parte o en la totalidad de la copa del olivo son: la defoliación, marchitez de las hojas (tornando a verde mate en las fases iniciales y posteriormente abarquillado y secado), necrosis de las inflorescencias (cuyas flores pueden quedar momificadas y persistir en el árbol afectado) y momificado y necrosis de frutos (**Figura 1**). Según la severidad y extensión de los síntomas en el árbol afectado puede llegar a producir la muerte del éste, debida a un colapso total del sistema vascular, o en otros casos, aunque menos frecuentes, puede producirse una recuperación sintomatológica en años sucesivos, dando lugar a una aparente disminución de la incidencia de la enfermedad a lo largo del tiempo (Jiménez Díaz *et al.*, 1998).



EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

La Verticilosis del olivo se identificó por primera vez en España en el año 1975 en campos de experimentación en Córdoba (Caballero *et al.*, 1980) aunque existían descripciones anteriores de ciertos síntomas que podrían corresponder a verticilosis. Desde entonces, la enfermedad se ha ido extendiendo de forma continuada, en proceso aparentemente paralelo al de modernización y extensión del cultivo del olivo, de forma que no es posible entender la Verticilosis del olivo sin haber comprendido la evolución de este cultivo y su historia más reciente (Jiménez-Díaz *et al.*, 2012).

En los últimos años ha habido un aumento paulatino en la incidencia y severidad de los ataques de Verticilosis fundamentalmente asociado a nuevas plantaciones de olivar establecidas con sistemas de cultivo intensivo o a su puesta en regadío, provocando importantes pérdidas económicas. Además la enfermedad se ha extendido a otras Comunidades Autónomas (e.g., Aragón, Castilla-La Mancha, Comunidad Valenciana, y Extremadura) (Jiménez-Díaz *et al.*, 2003; 2012; Landa *et al.*, 2009).

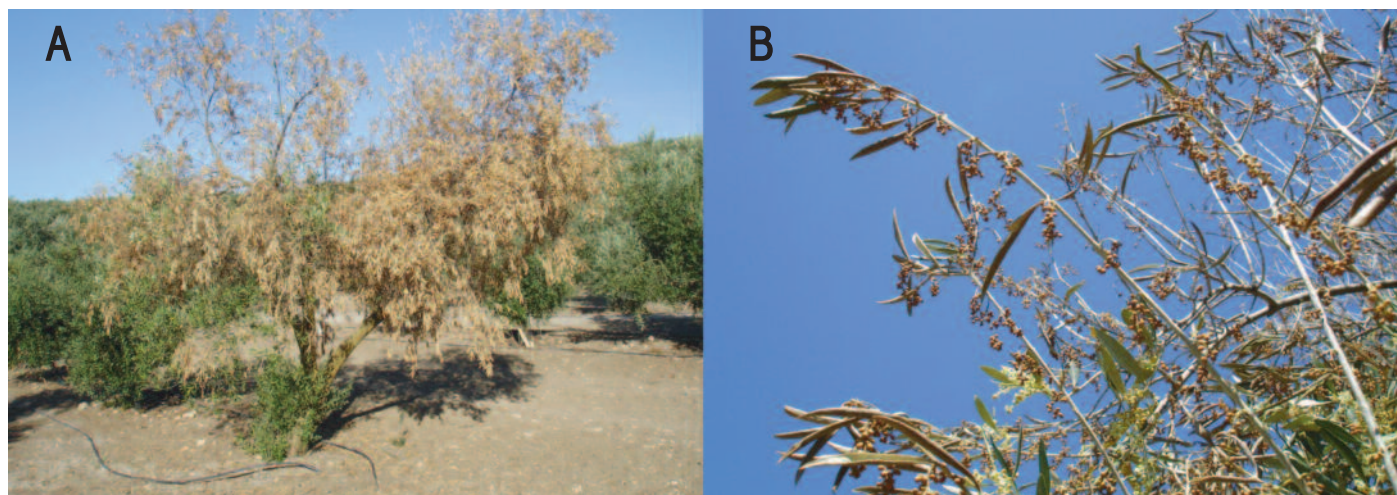


FIGURA 1. Síntomas característicos de la Verticilosis del olivo: (A) Colapso o muerte total de la planta (B) Marchitez de hojas e inflorescencias (Fotos: J. L. Trapero)

CONTROL DE LA VERTICILOSIS

Las estrategias de manejo de las enfermedades de los cultivos en todo el mundo están fundamentadas principalmente en el uso de resistencia genética en las plantas y la aplicación de materias químicas activas contra los patógenos.

Sin embargo, el uso de formulaciones químicas en la agricultura está cada vez más restringido por: 1) la legislación vigente que prohíbe gran número de materias activas en muchos países, 2) el impacto negativo en el medio ambiente, y 3) la pérdida

de aceptación de productos agrícolas tratados con pesticidas por parte de los consumidores en los mercados comerciales europeos.

Actualmente, las únicas estrategias de manejo disponibles para el control de la Verticilosis del olivo son de tipo preventivo, y pueden ir dirigidas tanto al material vegetal como al lugar donde éste va a ser o está establecido. En cualquiera de los casos, todas ellas deberían ser llevadas a cabo de forma conjunta puesto que desestimar la aplicación de alguna de ellas supone incrementar la ineficacia de las otras.

► Estrategia de manejo integrado

En consecuencia, basándonos solamente en las características inherentes de la enfermedad, la puesta en práctica de una estrategia de manejo integrado de la Verticilosis del olivo mediante medidas de carácter preventivo incluiría: 1) Evitar el uso de suelos infestados por *V. dahliae*, así como la proximidad de la plantación a cultivos herbáceos susceptibles a éste, en particular algodón.

2) Analizar el suelo sobre su contenido en microesclerocios (estructuras de supervivencia

de *V. dahliae* a las que se le reconoce una viabilidad de más de 10 años), para lo cual se dispone de métodos microbiológicos y moleculares contrastados experimentalmente.

3) Evitar el riego con aguas que puedan contener estructuras infectivas del patógeno.

4) Desinfestar el suelo que contenga inóculo elevado o virulento del hongo, ya sea de forma generalizada o localizada, mediante solarización y/o aplicación de productos fumigantes autorizados (si esto es viable económicamente para la explotación).

5) Aplicación de prácticas culturales o buenas prácticas agrí-

Tractores de perfil bajo R3.TB



R3. TB 85-100

Los tractores de perfil bajo R3. TB son referente dentro del segmento de tractores especializados para el **olivar y almendro, así como para zonas de montaña**, gracias a su bajo centro de gravedad.

Las dos versiones 85 y 100 permiten cubrir las diferentes necesidades de potencia, con la posibilidad de montar inversor electrohidráulico y múltiples equipamientos opcionales.

Pregunte en su concesionario oficial Lamborghini.



Una especie única.

LamborghiniTrattori
www.lamborghini-tractors.com



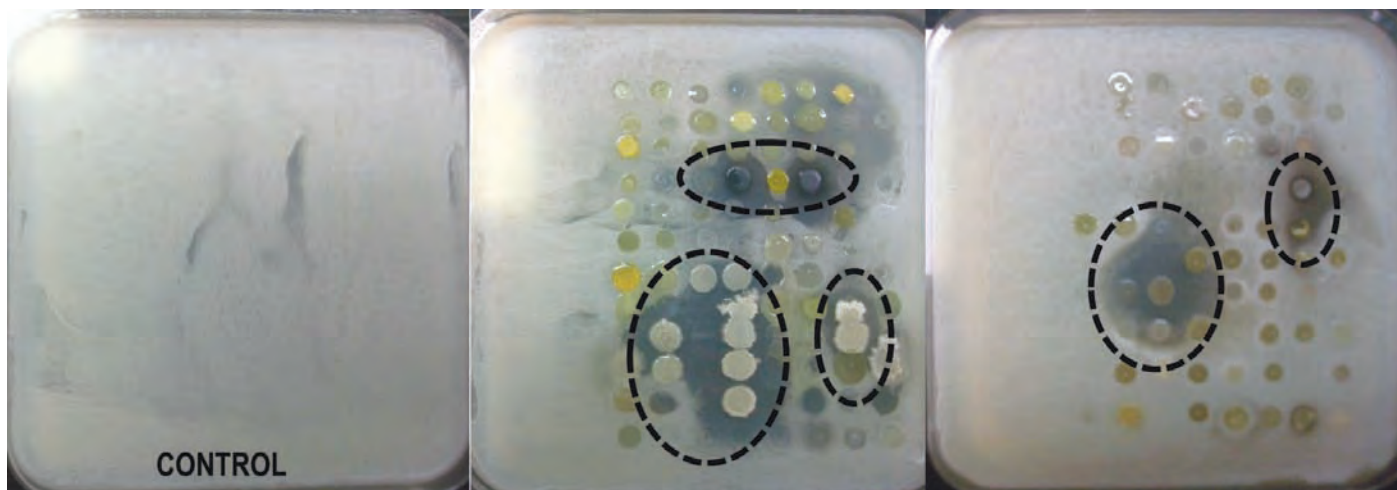


FIGURA 2. Selección inicial de aislados bacterianos por su capacidad antifúngica contra *Verticillium dahliae* patotipo defoliante, previa a la caracterización de mecanismos de biocontrol (Fotos: G. Contreras)

colas para evitar la dispersión de inóculo.

6) Utilizar material de plantación certificado libre de *V. dahliae*.

7) Utilizar material de plantación tolerantes o menos susceptibles a la Verticilosis.

8) La protección de ese material vegetal y del ya establecido de la infección por el patógeno mediante la aplicación de agentes de control biológico (ACB) antagonistas del patógeno (Jiménez-Díaz *et al.*, 2003; 2010; Landa *et al.*, 2009).

BACTERIAS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES

Las interacciones planta-microorganismo en la rizosfera y endosfera ha sido objeto de numerosos estudios, ya que las comunidades bacterianas desempeñan un importante papel en el balance, desarrollo y funcionamiento del ecosistema suelo en diferentes sistemas agrícolas en muchas especies de plantas cultivadas. Los resultados de estas investigaciones han demostrado que la composición de las comunidades microbianas asociadas a las plantas es altamente específica y que las interacciones que ocurren son el resultado de un reconocimiento recíproco entre ambos organismos.

En diversos estudios se ha demostrado que las plantas cultivadas han desarrollado una estrategia para estimular y promover el desarrollo de grupos específicos de microorganismos antagonistas autóctonos como primera línea de defensa contra patógenos de suelo (Cook *et al.*, 1995; Landa *et al.*, 2006; Weller *et al.*, 2007). Por lo tanto, el sistema radical de la planta es un importante nicho de microorganismos aún inexplorados que pueden constituir un importante reservorio de antagonistas contra patógenos de plantas.

La utilización de microorganismos antagonistas como ACBs de patógenos está considerada un componente básico de las medidas de control de enfermedades para utilizar de forma combinada junto a todas las estrategias disponibles de menor impacto medioambiental y de esta forma contribuir a la sostenibilidad del cultivo. Esto indudablemente supone que el conjunto de métodos erradicativos utilizados para el control de la Verticilosis, en el futuro, podrían complementarse con el control biológico, desarrollando nuevos métodos de manejo integrado de la enfermedad (Landa *et al.*, 2009; Tjamos, 1993; Trapero y Blanco, 2008).

En el caso particular del olivo, cada vez es más frecuente la incorporación de nuevas tecnolo-

// EL SISTEMA RADICAL DE LA PLANTA ES UN IMPORTANTE NICHOS DE MICROORGANISMOS AÚN INEXPLORADOS QUE PUEDEN CONSTITUIR UN IMPORTANTE RESERVORIO DE ANTAGONISTAS CONTRA PATÓGENOS DE PLANTAS //

gías mediante el uso de inoculantes microbianos durante la producción en vivero que incluyen aplicación de bioprotectores, fitoestimuladores o biofertilizantes para incrementar la calidad y vigor de los plantones. El interés actual en aplicar esta tecnología en olivar de bajo impacto al medio ambiente ha enfatizado el estudio y manejo de las interacciones microbianas en el suelo y rizosfera de olivo por nuestro grupo de investigación (Aranda *et al.*, 2010a).

BACTERIAS AUTÓCTONAS DE OLIVAR ANTAGONISTAS DE *V. DAHLIAE*

Lo deseable es que los ACB de agentes fitopatógenos estén adaptados a diversos ambientes, o al menos a las condiciones ambientales donde deben actuar, y que además basen su capacidad en su potencialidad para desarrollar y/o inducir diferentes mecanismos de control biológico contra el patógeno, y que al mismo tiempo directa o indirecta-

mente promuevan la sanidad y crecimiento de las plantas sin causar efectos negativos en el medio ambiente.

Por ello en nuestro grupo de investigación desarrollamos un enfoque de análisis polifásico, en el que inicialmente examinamos la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas totales tanto en la rizosfera de olivos silvestres de diez zonas diferentes de las provincias de Cádiz y Córdoba y de más de 90 fincas comerciales de olivar con distintas características agronómicas en las provincias de Córdoba, Granada, Jaén, y Sevilla utilizando un enfoque independiente del cultivo de estos microorganismos.

► Metodología

- Primero, utilizamos la técnica de análisis molecular FT-RFLP, basada en la amplificación del ADN bacteriano (la región 16S ADNr) y que nos ha permitido obtener un perfil genético o 'barcoding' de cada rizosfera.

Nuestros resultados revelaron una alta heterogeneidad en la composición de las comunidades bacterianas de la rizosfera, sugiriendo la existencia de comunidades específicas en función del genotipo de la planta, localización geográfica, y sistemas de manejo agronómico, siendo cada reducto de olivares silvestres o cultivados un reservorio único de diversidad microbiana (Aranda *et al.*, 2011a).

- Para tener éxito en el desarrollo de estrategias de control biológico de enfermedades lo deseable es que los ACB estén adaptados al medioambiente donde se deban aplicar, por ello en segundo lugar, procedimos a aislar bacterias autóctonas de este nicho ecológico (la rizosfera de olivo) e investigamos el potencial antagonista de esas poblaciones bacterianas cultivables asociadas a la raíz de olivares de toda Andalucía (Aranda *et al.*, 2011a). Seguidamente se determinó el potencial antagonista *in vitro* de los aislados bacterianos obtenidos mediante técnicas cultivo-dependientes enfrentando estas bacterias en cultivos duales frente *V. dahliae* patotipo defoliante, para determinar la capacidad de producir compuestos de naturaleza 'fungicida', que se determinó por la existencia de un halo de inhibición (Figura 2). De un total de 675 aislados bacterianos de la rizosfera y endosfera de olivos silvestres, 94 (14%) mostraron una

TABLA 1 / Distribución de las cepas antagonistas predominantes contra *Verticillium dahliae* patotipo defoliante aisladas de la rizosfera y endosfera del olivo cultivado en Andalucía

PHYLA	FAMILIA	GENERO	RIZOSFERA	ENDOSFERA	(%)
Firmicutes	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	30 ^a	24 ^a	57 ^b
	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	3	4	7.4
Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	19	7	27
	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	3		3
	Enterobacteriaceae	<i>Rahnella</i>		1	1
Actinobacteria	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	1		1
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>		2	2.1

^a Número total de cepas antagonistas asignadas a cada población

^b Proporción del total de antagonistas identificados provenientes de olivo silvestre incluyendo ambas poblaciones

fuerte actividad antagonista *in vitro* contra *V. dahliae* patotipo defoliante. La proporción más alta de antagonistas se obtuvo de la rizosfera (59,6%) en comparación con la endosfera (interior de la raíz) (40,4%).

Posteriormente identificamos los antagonistas de *V. dahliae* seleccionados mediante técnicas de secuenciación de un fragmento de su ADN para evitar la selección de organismos incluidos en el listado Agentes Biológicos del grupo 2, que podrían presentar riesgo potencial para la salud humana.

La identificación de los antagonistas mediante la secuenciación del gen 16S del ADN indicó que la mayoría de las bacterias pertenecían a los géneros *Bacillus* (56,4%), *Pseudomonas* (27,7%) y *Paenibacillus* (7,4%). Asimismo, varios de los aislados bacterianos que se identificaron no habían

sido previamente citados en olivo incluyendo *Acinetobacter* sp. (3,2%), *Chryseobacterium vrys-taense* (2,1%), *Rhodococcus wratislaviensis* (1,1%), y *Rahnella* sp. (1,1%) (Tabla 1). En la actualidad este procedimiento se está aplicando en nuestro laboratorio a otros aislados bacterianos (1500) procedentes de fincas comerciales de olivar.

- Finalmente, se caracterizó el potencial biotecnológico de estos potenciales ACB mediante evaluación *in vitro* de la producción de hormonas y diversos enzimas hidrolíticos y compuestos antimicrobianos. En total, la mayoría de los antagonistas (entre un 58,5 a 78,3%), mostraron actividad proteolítica, lipolítica, quitinolítica, produjeron ácido indol-acético y sideróforos. Todas estas actividades están descritas como importantes en cualquier bacteria antagonista que se

quiera usar como ACB de enfermedades de plantas.

Además, aislamos e identificamos por primera vez nuevas especies de bacterias pertenecientes al género *Duganella* spp. asociadas con la rizosfera de olivo que son capaces de producir violaceína, un metabolito secundario de color azul-morado con importantes aplicaciones biológicas, médicas e industriales de alto interés biotecnológico, y que ha dado lugar a una patente de protección intelectual (P201031655 y PCT/ES2011/070771; Aranda *et al.*, 2011b).

De acuerdo a nuestra información, estos trabajos representan el primer estudio centrado en determinar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas presentes en el suelo rizosférico y raíces de olivo y su potencial como una nueva fuente de ACB antagonistas contra *V. dahliae*.

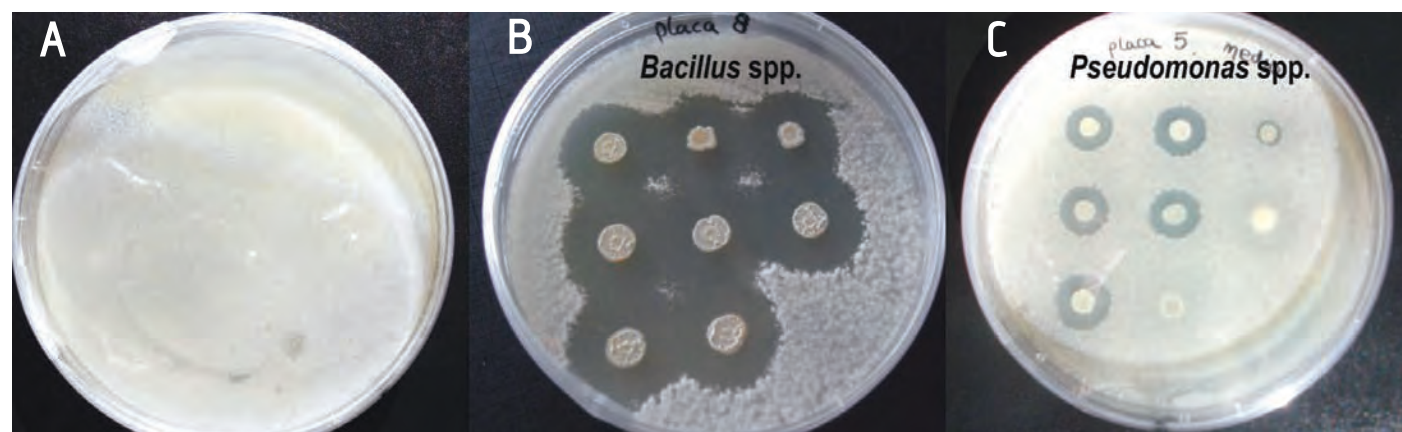


FIGURA 3. Confirmación de los aislados bacterianos más efectivos como potenciales ACB contra *Verticillium dahliae* patotipo defoliante. A= Control sin bacterias; B= Aislados de *Bacillus* spp.; C= Aislados de *Pseudomonas* spp. (Fotos: C. Cantalapiedra).

FACTORES IMPLICADOS EN LA EFECTIVIDAD DEL CONTROL BIOLÓGICO

Los avances significativos que se han producido durante los últimos 20 años sobre la caracterización, ecología y modo de acción de una gran diversidad de ACB, y el énfasis en el uso preferente de estrategias no químicas en la lucha contra las enfermedades de los cultivos, puede haber favorecido la percepción de que el control biológico es fácil y de eficiencia consistente. No obstante, son numerosos los casos que alertan de la falta de consistencia y variabilidad en los resultados de control biológico.

Esto es debido a la influencia de una variedad de factores que afectan a los patosistemas (e.g., densidad del inóculo y virulencia del patógeno, genotipo del cultivar, planta huésped, temperatura, etc.) y de las complejas interacciones que tienen lugar entre el patógeno, la planta, el ACB y el ambiente (Landa *et al.*, 2001; 2003; 2004).

Uno de los aspectos que más influyen en el fracaso en la actividad de un ACB se debe a que los organismos que se introducen proceden de ecosistemas diferentes de las zonas donde deben actuar y no están adaptados ni al ambiente ni al ecosistema donde deben ejercer la actividad de control biológico.

EN QUÉ SE HA DE BASAR LA INVESTIGACIÓN

Para que el control biológico llegue a ser un componente útil de un Sistema de Control Integrado de Enfermedades es necesario superar limitaciones en nuestro conocimiento a través de un incremento de la investigación en determinadas áreas:

1) El conocimiento exacto de las poblaciones del patógeno presentes en el campo (niveles y diversidad genética y patogénica), así como los niveles de enfermedad a partir de los cuales



FIGURA 4. Vista general de experimentos para determinar la actividad de control biológico de aislados bacterianos seleccionados (Fotos: G. León)

el patógeno puede causar pérdidas económicas.

2) El conocimiento más completo acerca de parámetros ecológicos importantes para la producción del cultivo, la eficiencia y la supervivencia de los ACB.

3) La identificación, y desarrollo (mediante ingeniería genética) de nuevos ACBs para el control de enfermedades de plantas.

4) El conocimiento de la ecología y biología del ACB, patógeno y planta huésped que puedan ayudar a disminuir los puntos de debilidad o explotar las fortalezas de estos organismos para incrementar el éxito de control. Similarmente, el conocimiento de las condiciones físicas, biológicas, y ecológicas óptimas para la acción frente al patógeno permitirían la optimización de estas condiciones para obtener los mejores niveles de suprimir el desarrollo de la enfermedad (Landa, 1999; Weller, 2007).

RETOS Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Actualmente, con las nuevas tecnologías disponibles, se han identificado ACBs efectivos contra patógenos diana mediante selección asistida por marcadores moleculares, se han caracterizado cepas con especificidad hacia un cultivo en particular o variedades de éste, determinar los factores bióticos y abióticos que afectan la colonización o eficacia del ACB, y caracterizar los genes involucrados en la competencia y supresión de los agentes fitopatógenos residentes en

el suelo por parte de estos ACB (e.g., Landa *et al.*, 2001; 2002; 2003; 2004; Weller, 2007).

Sin embargo, uno de los grandes retos en la actualidad sigue siendo el desarrollo de tecnologías para la óptima incorporación de estos ACBs en el campo, en el momento adecuado y de forma duradera, así como poder desarrollar nuevas formulaciones comerciales con alta calidad, y viabilidad y a un precio asequible para el agricultor.

En las investigaciones que venimos desarrollando en nuestro grupo de investigación hemos superado parte de las limitaciones arriba mencionadas y disponemos de conocimiento científico que permitirá disminuir parte de las incertidumbres para lograr la aplicabilidad de estos ACB en campo, si bien aún queda mucho trabajo experimental por llevar a cabo.

Actualmente se están evaluando los aislados bacterianos en estaquillas de olivo de seis meses de edad en condiciones de invernadero, algunos de los cuales presentan actividad prometedora (Figura 4). Sin embargo, son muchas las etapas que quedan por desarrollar desde la selección de los ACB más efectivos para evaluarlos en plantones de olivos de mayor edad hasta realizar ensayos en condiciones de campo. Finalmente, el/los organismos efectivos deberían ser formulados y registrados, aspecto en el cual las empresas privadas con interés en su explotación posterior son un eslabón fundamental en la cadena.

Todas estas etapas de desarrollo de un formulado de ACB de naturaleza bacteriana, autóctono de olivo y efectivo frente a la Verticilosis del olivo no pueden tener lugar sin la participación y financiación de empresas y organismos públicos y privados. Si bien la situación actual en la que nos encontramos de falta de disponibilidad de recursos económicos, no facilita el poder acortar los plazos para alcanzar un formulado comercial de un ACB efectivo contra la Verticilosis del olivo en el futuro cercano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores son miembros del Grupo de Investigación AGR136 "Sanidad Vegetal" del Plan Andaluz de Investigación, Junta de Andalucía. Las investigaciones de los autores referidas en este artículo han sido financiadas por diversos proyectos (Grupo PAIDI AGR-136, AGL2008-00344, y P10-AGR-5908) del Ministerio de Ciencia e Innovación, la Consejería de Innovación Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía y los fondos FEDER de la Unión europea. Los autores agradecen a todos los miembros del grupo de Investigación AGR136 que de alguna u otra forma han contribuido a las investigaciones recogidas en el presente artículo.

BIBLIOGRAFÍA

Queda a disposición de los lectores en el mail redaccion@editorialagricola.com