Ejemplo en la interacción pimiento - Phytophthora capsici causante de la 'tristeza'.

### Control biológico por microorganismos antagonistas

M. EZZIYYANI, A. SID AHMED, C. PEREZ SANCHEZ, M.E. REQUENA, M.E. CANDELA

Universidad de Fisiología Vegetal Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biologia, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo

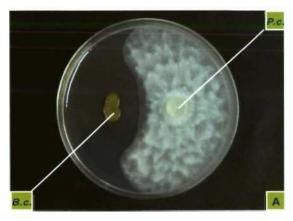
Actualmente se entiende por biocontrol la reducción de la intensidad o las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, lograda mediante la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar. En este último caso el biocontrol consiste en la utilización de microorganismos naturales o modificados, para reducir los efectos de organismos indeseables, favoreciendo al mismo tiempo el desarrollo de los microorganismos beneficiosos para las plantas. Los microorganismos antagonistas comprenden cualquier organismo que interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos.

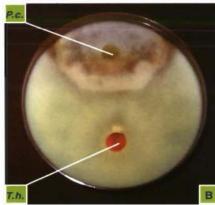
Para lograr el control biológico se pueden seguir tres vías: Exploración en el propio medio de los agentes de biocontrol, introducción o liberación masiva de agentes de control y manipulación del ambiente para favorecer el desarrollo de los antagonistas naturales presentes en el mismo. Hace décadas quedó establecido que las interacciones microbio-microbio, son clave en el desarrollo y función de la rizosfera y que las poblaciones de microorganismos pueden interaccionar de manera sinérgica (o aditiva) o bien antagónica. Es obvio que aquellos microorganismos que ejercen algún tipo de antagonismo sobre otros microorganismos patógenos de la planta, benefician indirectamente, el desarrollo de ésta, en términos de la protección de su estado sanitario. Tal actividad microbiana, que funciona por mecanismos de competencia por nutrientes o sitios de colonización, producción de sustancias antimicrobianas, o enzimas extracelulares, opera de forma natural desde que existen las plantas. Sin embargo, puesto que esta actividad natural no está controlada específicamente, sus resultados son impredecibles. Es más, la aplicación de pesticidas funguicidas y otros agroquímicos puede incluso interferir con dicho recurso natural. Surge entonces el concepto práctico de control biológico de enfermedades, que implica el manejo racional y dirigido de organismos apropiados, componentes comunes de los agrosistemas, para proteger a la planta frente al ataque de patógenos diversos. Entre ellos podemos distinguir los microorganismos productores de enfermedades como virus, bacterias,

■ Se entiende por biocontrol la reducción de la intensidad o las actividades productoras de enfermedades de un patógeno o parásito, lograda mediante la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar

hongos, nematodos, etc, y los organismos productores de plagas como los insectos.

El control biológico de los patógenos es generalmente muy específico y usa organismos que atacan o interfieren con patógenos específicos. En algunos casos es posible encontrar una única cepa microbiana que sea eficaz en muchos ambientes, pero en la mayoría de los casos, se requieren cepas diferentes en localidades diferentes. En general, la aplicación de tales inoculantes, sigue demandando contraste y validez agronómicos, aunque nunca ha perdido su carácter de práctica "prometedora". La necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos y productos fitosanitarios de síntesis ha dado paso a la práctica de la inoculación. En efecto, la demanda impuesta por la sostenibilidad está conduciendo al uso de estrategias que mantenga una protección del medio ambiente. En este contexto, el uso de inóculos microbianos, incluyendo algunos que han sido modificados genéticamente, esta cobrando nuevamente interés. Los microorganismos mas usados pertenecen a los géneros Rhizobium, Pseudomonas, Bacillus, Trichoderma, Streptomyces, etc., Aunque también los hongos micorrícicos, han sido objeto de investigaciones orientadas a su aplicación práctica. El control biológico es el mejor método de optimizar, a propósito, las actividades de las especies beneficio-





sas y conseguir reducir las actividades dañinas de ciertas plagas y enfermedades, pero en cualquier caso siempre hay que controlar las alteraciones que la liberación de los antagonistas puede suponer para el equilibrio de un ecosistema y tratar de minimizar los riesgos.

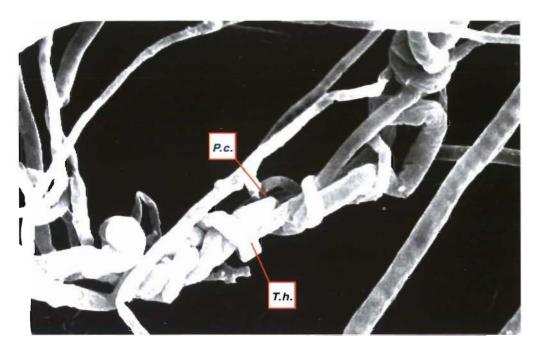
En la práctica, el control biológico se puede enfocar de tres formas: En primer lugar está el control biológico clásico. En este sistema los microorganismos antagonistas se obtienen en su medio natural y se utilizan en otro, donde ellos no existían antes. En este lugar la plaga o enfermedad se había establecido porque ha vencido a los microorganismos autóctonos que existían y ya no tiene enemigos naturales. La introducción de los nuevos organismos de biocontrol conduce a una reducción a largo plazo de la población de la plaga o enfermedad en los habitats elegidos. Típicamente, el control biológico clásico ha sido el de más éxito en el sistema agro-económico o en los cultivos de árboles, viñedos, plantas ornamentales y bosques perennes. Aunque los éxitos de la introducción del control biológico son constatables, el futuro es muy difícil de predecir. Casi solo el 30% de las introducciones han permanecido estables y la supresión con éxito de ciertas plagas y enfermedades ha ocurrido menos frecuentemente de lo esperado. La clave para el éxito en casi todos los proyectos de control biológico es el descubrimiento y la importación de enemigos naturales que produzcan altos niveles de parasitismo o depredación en los lugares nativos de la plaga o enfermedad.

Otros factores, tales como la adaptación de los enemigos naturales al clima del nuevo lugar, búsquedas adecuadas y habilidades de utilización que permita descubrir y controlar la plaga o enfermedad, cuando todavía es baja la concentración del inóculo del patógeno, parece ser el punto crítico. En segundo lugar tenemos el control biológico conservador. Este es el que menos se asemeja a un verdadero biocontrol, pero es la base real del manejo integrado de plagas. Consiste fundamentalmente en favorecer la abundancia de los enemigos naturales de los patógenos causantes de plagas, reduciendo influencias dañinas y resaltando las positivas. Se consigue por medio de insecticidas de espectro reducido; cambiando el tiempo de aplicación del insecticida para evitar daños a sus enemigos naturales con ciclos de vida distintos; proporcionando habitas alternativos para que los enemigos naturales tengan alimentación, un lugar para reproducirse o invernar y provisión de néctar ya sea por plantas que cubren el suelo o por selección de una variedad de plantas que tengan nectarios como alimento para enemigos naturales. En tercer lugar tenemos el control biológico aumentativo. Con este se pueden seguir dos tácticas: el control inoculativo y el control inundativo.

Fig.1. Confrontaciones in vitro donde se aprecia varios modos de acción ejercidos por antagonistas como la bacteria Burkholderia cepacia (B.c.) y el hongo Trichoderma harzianum (T.h.) sobre el patógeno Phytophthora capsici (P.c.). [A]: "Antibiosis v competición por los nutrientes y por el espacio". Ejemplo de inhibición del crecimiento vegetativo de P. capsici en presencia de la bacteria B. cepacia. [B]: "Micoparasitismo y lisis enzimática". Ejemplo de inhibición del crecimiento del patógeno por el hongo T. harzianum cuva colonia crece sobre P. capsici.

El control inoculativo consiste en favorecer la llegada y el desarrollo de los enemigos naturales que se quieren combatir, previamente al inicio o crecimiento de la cosecha de las plantas a proteger, con el fin de proceder a su disminución y destrucción. Este método de control biológico es la base para el control de plagas y enfermedades en muchos sistemas de invernadero. Algunos patógenos de insectos tienen numerosas ventajas sobre los pesticidas químicos convencionales. Estos incluyen: especificidad para los organismos objetivo o a un número limitado de especies huésped, poco o ningún impacto directo sobre parásitos y depredadores invertebrados, no residuos tóxicos, compatibilidad con otros agentes de biocontrol, no dañinos a vegetales y plantas, posibilidad de control a largo plazo, adaptable a la modificación genética de la biotecnología y fácil aplicación. El control inundativo es diferente de las estrategias clásicas e inoculativas, por lo que la liberación de enemigos naturales -y no de sus descendientes- son los agentes activos de control. Típicamente, liberaciones a gran escala de enemigos naturales se realizan repetidas veces durante el ciclo de la cosecha.

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen las enfermedades. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas. No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta o en las heridas. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es importante a tener en cuenta para seleccionar a un antagonista. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resisten-



cia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción. Se han descrito varios mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción para controlar el desarrollo de patógenos. Entre ellos encontramos la inducción de resistencia, pero fundamentalmente el biocontrol se basa en la antibiosis y competencia por el espacio o por los nutrientes (Fig. 1) y en las interacciones directas con el patógeno: micoparasitismo y lisis enzimática (Fig. 2). Un ejemplo de control biológico de una enfermedad, utilizando microorganismos antagonista, es el caso de la "tristeza" del pimiento causada por el oomiceto patógeno Phytophthora

El pimiento es una hortícola, angiosperma de la Familia Solanaceae, género Capsicum, especie annuum. En la Región de Murcia, se cultiva pimiento tanto al aire libre como en invernadero y aunque antiguamente la variedad mas cultivada era la "bola" que se destinaba a ser transformada en pimentón, actualmente la mayor superficie de cultivo, aproximadamente 1800 hectáreas se utiliza para variedades de carne gruesa tipo "California" para consumo

Fig.2. Detalle del "Micoparasitismo" debido al enrollamiento masivo de las hifas de T. harzianum alrededor de las de P. capsici. Fotografía de microscopía electrónica de la interacción entre el hongo antagonista y el oomiceto patógeno.

en fresco (Fig. 3). La mayor parte se localiza en el Campo de Cartagena y acapara directa o indirectamente un gran número de mano de obra. El cultivo de pimiento en invernaderos cubiertos con plástico, está ampliamente extendido para responder a las exigencias de este cultivo fuera de la temporada. En los últimos años, se han empezado a probar los cultivos sin suelo y con sistemas de riego cerrados "cultivos hidropónicos" que tienen como objetivos la limitación de las infecciones fitopatogénicas del suelo y el reciclaje de la disolución nutritiva para el mejor aprovechamiento de los nutrientes. Porque efectivamente, en invernadero la producción se puede extender a todo el año, pero

■ Para lograr el control biológico se pueden seguir tres vías: Exploración en el propio medio de los agentes de biocontrol, introducción o liberación masiva de agentes de control y manipulación del ambiente para favorecer el desarrollo de los antagonistas naturales presentes en el mismo

tiene el serio inconveniente de necesitar esterilizar los suelos antes de la siguiente plantación, ya que se infectan por los numerosos patógenos que crecen en las cálidas y húmedas condiciones ambientales que se dan en el invernadero.

Una de las enfermedades más devastadoras que afectan a los pimientos es la conocida por "tristeza" o "seca" causada por Phytophthora capsici. El nombre de Phytophthora deriva del griego (phyton: planta y phthora: destrucción). Phytophthora capsici (Fig. 4) es un hongo telúrico que taxonómicamente pertenece a la clase Oomycetes y al orden de los Peronosporales. La mayoría de los Oomycetes son acuáticos. Su forma de supervivencia ante condiciones adversas es por zoosporas, las cuales poseen dos flagelos laterales, uno liso y otro con bárbulas. Phytophthora capsici tiene un poder de competición saprofítica muy bajo en el suelo. Sin embargo, el patógeno puede guardar su poder infectivo en el suelo durante algunos días en forma de zoosporas, algunas semanas en forma de esporocistos y varios años en forma de clamidosporas y de oosporas. Se ubica predominantemente en las capas mas superficiales del suelo, ya que al ser un hongo telúrico esta fuertemente relacionado con el potencial hídrico del mismo.

La forma de diseminación en el caso de este tipo de hongos es por agua de riego, debido a su carácter acuófilo y a la presencia de zoosporas móviles. Además por la salpicadura de las gotas de agua al chocar con el suelo se ha encontrado una diseminación horizontal de hasta un metro. P. capsici inverna en forma de oosporas, clamidosporas o micelio en el suelo o en las raíces que ha infectado. El hongo forma más micelio y zoosporas durante las estaciones húmedas y moderadamente frías y puede transmitir la enfermedad a otras plantas. En la primavera, las oosporas y clamidosporas germinan en forma de zoosporas mientras que el micelio



prosigue su desarrollo y/o produce zoosporangios que liberan zoosporas. Estas últimas nadan en el agua del suelo e infectan las raíces de la planta. La evidencia reciente sugiere que las zoosporas de P. capsici, sobrevivan en suelo por lo menos cinco años y pueden seguir siendo contagiosas por 10 años. Puesto que las zoosporas se forman por el acoplamiento de diversas paredes, representan una combinación de las paredes de dos genes (A1 y A2), esto puede ayudar al patógeno a desarrollar resistencia a los fungicidas. Los estudios etiológicos han permitido determinar a los patógenos Phytophthora capsici Leon. Verticillium dahliae Kleb., así como la asfixia radicular, agentes responsables de alteraciones que pueden denominarse por su especial sintomatología dentro de lo que comúnmente llamamos "tristeza". El viento no tiene influencia en la diseminación de P. capsici.

La primera descripción de *Phytophthora capsici* como causante del marchitamiento del pimiento se debe a Leonian en 1922 en Norteamérica. La enfermedad se describe en España por primera vez en 1964 y ha sido denominada tradicionalmente "tristeza" o "seca" (Fig. 5). Sus efectos

Fig. 3. Plantas de pimiento cultivadas en condiciones controladas bajo plástico, que han sido inoculadas con el patógeno *P. capsici* y tratadas con microorganismos antagonistas agentes de biocontrol. Todas las plantas sobreviven a la infección menos una (control, sin tratamiento) que muere.

son mortales, pues penetrando por las raíces impide la absorción de agua y nutrientes y cuando la planta presenta los primeros síntomas, ya está invadida y no tiene cura. Los síntomas son: marchitamientos totales o parciales y menor desarrollo radicular de la planta, debido a la pérdida de turgencia de los tejidos. Los tallos sin embargo, permanecen erectos con las hojas y frutos prendidos a la planta. En condiciones óptimas de temperatura (21-31°C), el proceso de infección de P. capsici consiste en la germinación de los esporangios (6-35 min), penetración (1-4 horas) e incubación (3-6 días). Con temperaturas de 5°C el hongo detiene por completo su desarrollo y a 0°C muere; en los límites superiores, a 38°C se paraliza, pero no muere con temperaturas aún mayores. El



# Rexolin® Q48



6% de Hierro. 4,8 orto-orto EDDHA

Para el tratamiento de las deficiencias de Hierro, pregunte por Rexolin® Q48 de Yara.

APOSTAMOS POR LA CALIDAD



info.iberian@yara.com

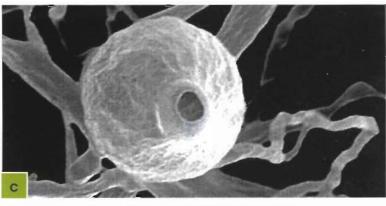
exceso de nitrógeno y de calcio en el suelo incrementa la enfermedad causada por *P. capsici*, mientras que el potasio la disminuye. También el pH bajo influye en la inhibición del hongo.

El ataque tiene lugar en las raíces o el cuello de la planta y se extiende hacia arriba por la base del tallo; se forma un chancro en el cuello y hay pudrición y ennegrecimiento de las raíces. Cuando las condiciones ambientales son favorables, el hongo crece y ataca la planta en sus distintos estadios de desarrollo. En las plántulas, P. capsici infecta en pocos días los órganos emergidos de la semilla y antes de salir del suelo les causa el ahogamiento y la muerte. En las plantas jóvenes, P. capsici ataca el tallo de la planta, a veces por debajo de la superficie del suelo o la raíz principal y antes de que aparezca la podredumbre por encima de la superficie del suelo, se ocasionan síntomas parecidos a

Fig. 4. Aspecto macroscópico y microscópico del patógeno Phytophthora capsici. [A]: P. capsici creciendo en medio líquido con formación de colonias esféricas que liberan zoosporas. [B]: Aspecto macroscópico de la colonia miceliana creciendo en medio sólido de patatadextrosa-agar (PDA). [C]: Detalle de un esporangio productor de zoosporas visto al microscopio electrónico de barrido (2300 X).









los producidos por la sequía en la parte aérea de la planta. En las plantas adultas, el hongo infecta primero a las raíces pequeñas y luego lentamente se extiende al resto de las raíces. Las partes aéreas de la planta tanto hojas como frutos, suelen dañarse cuando se les aplica material infectado con el patógeno.

Una de las formas de luchar contra la enfermedad es desinfectar los suelos de cultivo antes y después de la plantación. Habitualmente se han utilizado pesticidas para ello, pero ya se sabe que la mayoría de estos productos químicos no son específicos y su aplicación en los campos de cultivo mata indiscriminadamente a un amplio rango de microorganismos e insectos, además de resultar tóxicos para los mamíferos, incluido el hombre.

Contra el patógeno *P. cap-sici*, la desinfección del suelo de cultivo sobre todo en invernade-

ros o cultivos protegidos suele hacerse con bromuro de metilo (BM). Así, los investigadores y técnicos en agricultura se están enfrentando a uno de los mayores retos de los últimos años, el de encontrar alternativas al bromuro de metilo para controlar plagas, malas hierbas y enfermedades de las plantas. La alternativa que se proponga debe tener eficacia similar al BM, y además de no con-

■ El control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas es una de las alternativas que más atención ha recibido en los últimos años. La existencia de microorganismos telúricos, asociados de forma natural con las plantas, los hace ideales para escoger entre estos, aquellos que inhiben a los patógenos

taminar el medio ambiente, fundamentalmente debe ser económico y viable, características que no han sido hasta ahora exigidas a ningún otro pesticida. El BM es el biocida que destaca por su amplio espectro de acción frente a los patógenos de los vegetales, así como su alta efectividad en cuanto a penetración y difusión en el suelo, incluso en aquellos que presentan contenidos de humedad y temperatura altos. Sin embargo, el BM no se retiene en su totalidad en el suelo, sino que del 50 al 95% pasa en forma de emisiones gaseosas a la estratosfera. Allí se liberan átomos de bromo que reaccionan con el ozono y otras moléculas estables que contienen cloro, dando lugar a una reacción en cadena que contribuye a la disminución de la capa de ozono, incrementando la emisión de ravos ultravioletas con los consiguientes riesgos para la salud y el medio ambiente. La evidencia



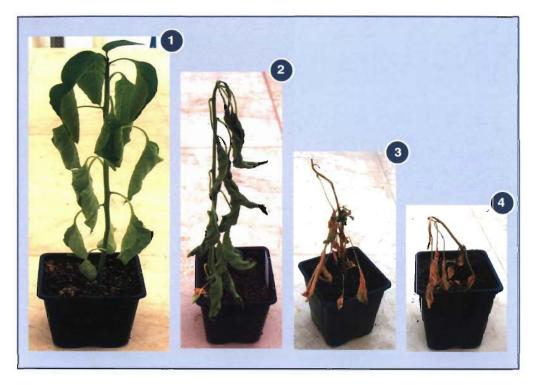


Fig. 5. Síntomas de la enfermedad "tristeza" o "seca" de la planta de pimiento cv. California wonder causada por *Phytophthora capsici*. Cronología del desarrollo a lo largo de 9 días.

científica de la destrucción de la capa de ozono por el BM, dio lugar a la toma de decisiones que contribuyesen a la retirada de este producto, apoyándose en acciones reguladoras. La 10ª Reunión del Protocolo de Montreal estableció, para los países desarrollados, un programa en el que se acordó la reducción, de forma gradual, de los usos agrícolas del BM, hasta llegar a su eliminación total para el año 2005 y para países del Artículo 5° su eliminación en el año 2015.

La retirada de un producto químico del mercado puede conducir, a corto plazo, al reemplazo de éste por otro producto que no esté prohibido, lo cual puede resolver el problema temporalmente, pero a medio y largo plazo, las soluciones sostenibles no pueden basarse en productos químicos, sino que deben ser principalmente métodos físicos, biológicos o la integración de ambos. Esta situa-









## Condiciones ideales para el crecimiento

Nuestro objetivo es crear y mantener las condiciones perfectas para el crecimiento y el desarrollo de cualquier producto dentro de un invernadero. El concepto Munters está formado por los paneles evaporativos CELdek®, la gama de ventiladores de Euroemme®, los sistemas Munters de distribución de agua, sistemas de control climático, calefactores y otros accesorios como persianas y filtros de luz que ayudan a crear un clima ideal y controlado.



Ventiladores Euroemme<sup>6</sup>



Paneles evaporativos



Calefactores



Sistemas de control climático CLIMATEline

#### Munters Spain S.A.

Europa Empresarial, Ed. Londres C/ Playa de Liencres № 2 28290 Las Matas - Madrid Tfno.: 91 640 99 02 Fax.: 91 640 11 32

Email.: marketing@munters.es

www.munters.es

www.munters.com



ción que es real, se acompaña actualmente por las exigencias medioambientales lideradas por la opinión pública sobre los productos químicos, que obligan a optar por estrategias más seguras y ecológicas que permitan mantener los patógenos y/o la enfermedad por debajo de un nivel aceptable. Por lo tanto, cualquier alternativa que permita el control de patógenos puede ser especialmente útil si al mismo tiempo ayuda a reducir agresiones que los productos químicos causan al medio ambiente.

El control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas es una de las alternativas que mas atención ha recibido en los últimos años. La existencia de microorganismos telúricos, asociados de forma natural con las plantas, los hace ideales para escoger entre estos, aquellos que inhiben a los patógenos. Así, el control biológico mediante el uso

de microorganismos antagonistas surge como respuesta a la búsqueda de nuevas formas de control de patógenos en la producción agrícola, en las que prima la calidad de las cosechas y el respeto a los recursos naturales y humanos. El control biológico es la respuesta a la creciente inquietud de la opinión pública en cuanto al uso abu-

■ Una de las formas de luchar contra la enfermedad es desinfectar los suelos de cultivo antes y después de la plantación. Habitualmente se han utilizado pesticidas para ello, pero ya se sabe que la mayoría de estos productos químicos no son específicos y su aplicación en los campos de cultivo mata indiscriminadamente a un amplio rango de microorganismos e insectos

sivo de productos químicos como los fertilizantes, pesticidas insecticidas y herbicidas.

Las investigaciones realizadas por el grupo de Investigación "Fitopatología" de la Universidad de Murcia, dirigidos por la Dra. Mª Emilia Candela han analizados diferentes microorganismos de biocontrol para ser utilizados como antagonistas, determinando modos de acción complementarios con los que reducir la enfermedad (Bibliografía). Actualmente ultiman los análisis de dosis y formulación de un biopreparado de antagonistas, capaz de inhibir totalmente al patógeno e impedir la incidencia de la enfermedad aún en cultivos de pimientos sobre suelos infectados por P. capsici.

#### Bibliografía

Bibliografía completa en: www.horticom.com?62425

