

Bacillus subtilis: Búsqueda y evaluación de un agente de control biológico frente al oídio de las cucurbitáceas

Diego Romero¹, Houda Zerrouh¹,
Laura García¹, Francisco Cazorla¹,
Juan Antonio Torés², Antonio de Vicente¹,
Alejandro Pérez-García¹

¹Departamento de Microbiología,
Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga.

²Estación Experimental La
Mayora (CSIC), Algarrobo Costa,
Málaga.

Oídio de cucurbitáceas: Introducción al problema

Las grandes superficies agrícolas de España dedicadas al cultivo de cucurbitáceas se ven afectadas anualmente por el oídio, una enfermedad causada por el hongo ascomiceto *Podosphaera fusca* (Torés et al., 1990). El hongo crece profusamente sobre la superficie de la planta dando lugar a la formación de manchas blancas pulverulentas, un síntoma que facilita el diagnóstico visual de la enfermedad (Imagen 1). Conforme la enfermedad avanza, las manchas llegan a fusionarse y extenderse al resto de la planta. El fruto que en raras ocasiones presenta estos síntomas, a la postre puede manifestar malformación o disminución de su calidad como resultado de la severidad con la que la enfermedad afecta al aparato fotosintético de la planta. Las condiciones ambientales son determinantes para la aparición y posterior desarrollo de la enfermedad, de forma que en cultivos en invernadero, donde la temperatura y humedad relativa son más estables que en cultivos al aire libre, el oídio llega a convertirse en un serio problema fitosanitario, que de no ser controlado puede mermar de forma considerable la producción.

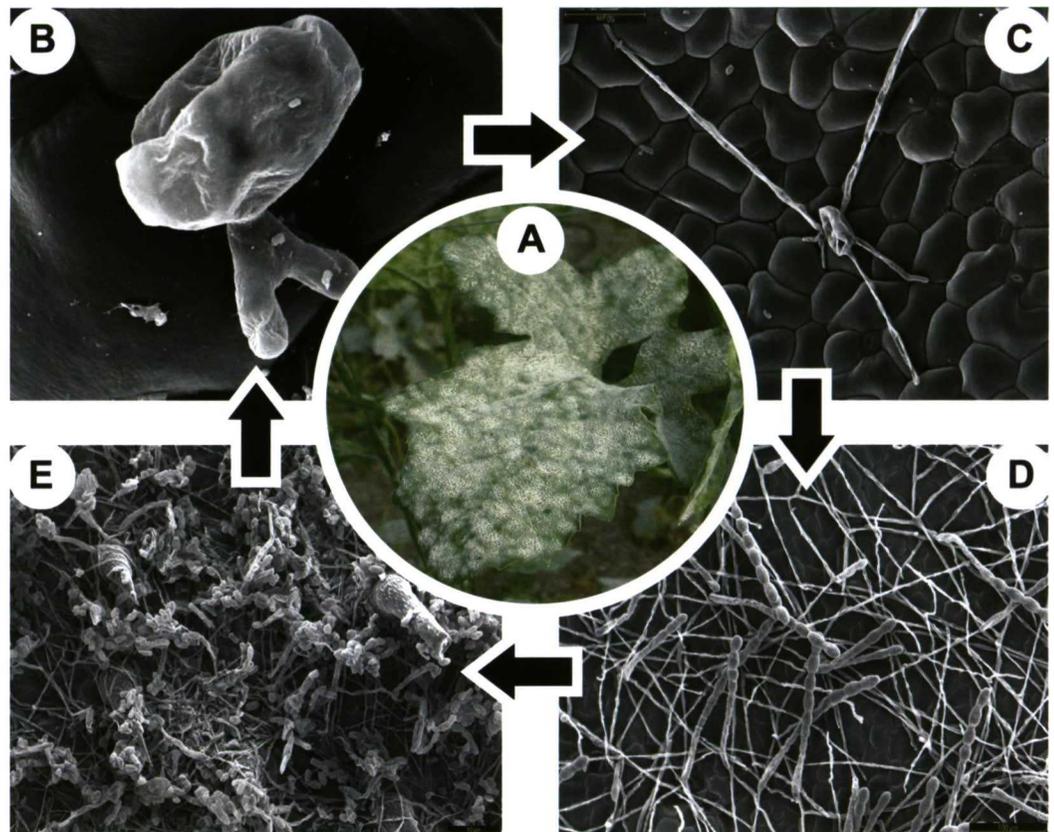


Imagen 1: El oídio de las cucurbitáceas, *Podospheera fusca*, causa síntomas fácilmente reconocibles (A). El ciclo asexual de vida del oídio comienza con la germinación de los conidios (B) sobre plantas susceptibles. Posteriormente el hongo crece formando unas hifas (C) que le permiten colonizar la superficie de las hojas y otras partes de la planta. A partir del micelio del hongo se forman los conidióforos (D) que portan conidios o esporas de reproducción asexual que una vez maduros son liberados (E) permitiendo la dispersión del hongo.

El control del oídio, al igual que otras muchas enfermedades fúngicas, depende fundamentalmente del uso intensivo de fungicidas entre los cuales

destacan la familia de las estrobilurinas (QoI) y los inhibidores de la demetilasa (DMI) (López-Ruiz et al., 2005). La forma de acción de estos for-

mulados frente a una diana muy específica, sufre un elevado riesgo de ser rápidamente superada por el patógeno, disminuyendo así su eficacia y

obligando a introducir nuevos formulados con el consiguiente esfuerzo económico. Así lo demuestra un estudio realizado por nuestro grupo en las principales zonas productoras de melón en la mitad sur de España durante el trienio 2002-2005, donde se ha puesto de manifiesto la estrecha vinculación entre los niveles variables de resistencia a diferentes estrobilurinas y DMI con su frecuencia de uso en las distintas zonas de cultivo (Fernández-Ortuño et al., 2003; López-Ruíz, 2004). Esta limitación práctica junto a la creciente demanda por parte de la sociedad de una agricultura menos agresiva y que dé lugar a productos más saludables libres de pesticidas, han forzado a la búsqueda de me-

didias de control alternativas que contribuyan a mitigar estos problemas sin que se produzca un excesivo incremento en los precios finales de los productos en el mercado. El control biológico es una estrategia de control más compatible con la conservación del medio ambiente y útil en aquellas enfermedades para las que no existen otras medidas fitosanitarias, o simplemente para poder reducir el empleo de pesticidas; sin embargo, muestra una serie de deficiencias y limitaciones que se deben solucionar para incrementar su aceptación en la agricultura actual (Fravel, 2005). El desarrollo de programas de control integrado (Integrated Management Programs, IMP), sin lugar a dudas, ha contribuido a

la implementación de muchos agentes de control biológico en la agricultura moderna. Como quedó claramente puesto de manifiesto en el monográfico de esta revista dedicada a la producción integrada, los IMP tienen como su principal objetivo, la racionalización del empleo de pesticidas, haciendo énfasis en la contribución que otros métodos de control tales como el control biológico puedan aportar al manejo de las enfermedades (Horticultura, volumen 25-nº 3).

Para el desarrollo de una estrategia de control fiable basada en el uso de agentes de control biológico es indispensable tener en mente el cultivo y patógeno a controlar, las propieda-

des intrínsecas del agente de control biológico y las condiciones ambientales en las que se lleva a cabo esta interacción antagonista (Paulitz y Bélanger, 2001). El conocimiento acumulado en nuestro laboratorio sobre diferentes aspectos del oídio de las cucurbitáceas, etiología, interacción con la planta y control químico, nos ha llevado a centrar parte de nuestro esfuerzo en la búsqueda de microorganismos antagonistas y en la evaluación de su potencial uso en el control biológico de la enfermedad, así como en el conocimiento de los mecanismos subyacentes implicados en su capacidad antagonista, todo ello como elementos claves para el diseño posterior de programas de control más racionales.

¡¡ PROTEJA SUS CULTIVOS !!



syngenta®

¿El Secreto?



- **SWITCH**, una respuesta activa y eficaz que protege los cultivos contra Botrytis y otras enfermedades, garantizando los mejores resultados.
- Utilícelo y observará en sus cultivos un aspecto más sano y duradero.
- Use **SWITCH**, sus cultivos se lo agradecerán.



SWITCH®
Más protección. Más eficacia.

Micoparasitismo como paradigma del control biológico del oídio

El frecuente aislamiento de otros hongos a partir de plantas afectadas por el oídio, así como el desarrollo externo del patógeno sobre la planta condujo, en una primera aproximación al problema, a considerar el empleo de estos hongos micoparásitos como la más plausible estrategia de control biológico de la enfermedad. Los estudios realizados en nuestro laboratorio con los hongos micoparásitos *Ampelomyces quisqualis* (AQ10®, Ecogen) y *Lecanicillium lecanii* (Mycotal®, Koppert Biological Systems) han confirmado de hecho la capacidad de ambos hongos de frenar eficazmente el desarrollo de la enfermedad, sobre todo como tratamientos preventivos, tras la aparición de los síntomas iniciales de la enfermedad, y en condiciones de baja presión de inóculo. Estos hongos parasitan el micelio y los conidióforos del oídio afectando tanto a la dispersión como a la reinfección a partir de los conidios, es decir, limitando la producción de inóculo secundario (Romero et al., 2002; 2003). Todos los trabajos realizados con hongos micoparásitos, sin embargo, coinciden en que su actividad está supe-

de HR local sobre la superficie de la planta durante el tiempo necesario para una eficiente germinación de las esporas del agente de control biológico. Este hecho ha restringido

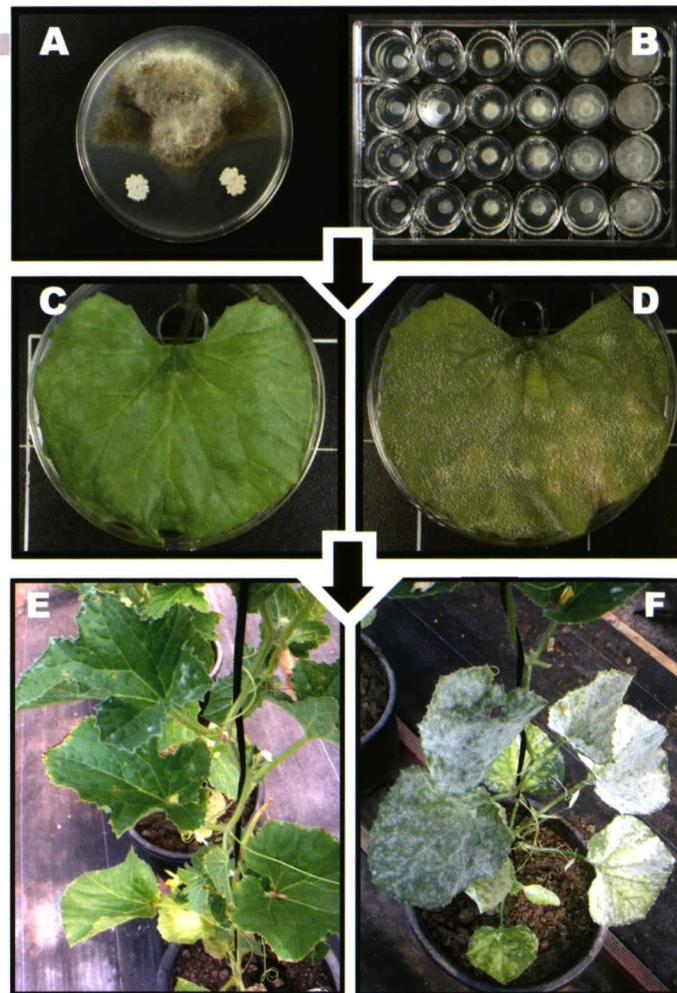


Imagen 2: Esquema de trabajo empleado para la selección de agentes de control biológico frente a *Podosphaera fusca*. Ensayos preliminares *in vitro* mostrando actividad antifúngica mediante la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* por células (A) y filtrados bacterianos libres de células (B) de *Bacillus subtilis* UMAF6614 y UMAF6639. Los ensayos de control biológico frente al oídio en condiciones de laboratorio mostraron un escaso desarrollo de la enfermedad en hojas de melón tratadas con células de *B. subtilis* (C) en comparación a las hojas no tratadas (D). Los ensayos de control biológico frente al oídio usando plantas de melón mantenidas en invernadero confirmaron la capacidad de las cepas de *B. subtilis* de reducir de forma considerable los síntomas de la enfermedad (E) en comparación a la severidad de la infección en plantas sin tratar (F).

enormemente su uso, de forma casi exclusiva a cultivos en invernadero donde se pueden conseguir condiciones ambientales favorables para el agente de control biológico.

No obstante, y a pesar del insuficiente desarrollo comercial experimentado respecto al inicialmente esperado, la lista de hongos micoparásitos es amplia y sigue en aumento (Kiss, 2003).

Lejos de la concepción inicial sobre el uso de un único agente de control biológico de amplia y generalizada capacidad de acción, numerosos estudios realizados con oídio y otros patosistemas han demostrado que la posibilidad de atacar a un patógeno en distintas fases de su ciclo de vida mediante el uso combinado de microorganismos con mecanismos de acción diferentes, aumenta notablemente las probabilidades de éxito en el control final de la enfermedad. Por ello, nos planteamos buscar otros microorganismos que mostraran una mejor adecuación y adaptación a las condiciones ambientales propias de las zonas de cultivo en España y que desarrollaran su acción protectora mediante mecanismos diferentes y complementarios al micoparasitismo.

Evaluación de potenciales agentes de control biológico del oídio de cucurbitáceas

Evaluación de potenciales agentes de control biológico del oídio de cucurbitáceas

El ciclo de vida del oídio, como ocurre con otros hongos, se inicia con la germinación de los conidios sobre una planta susceptible de ser infectada (Imagen 1), por lo que, un agente de control biológico que actúe en esta fase inicial debería reducir de forma equivalente el desarrollo posterior de la infección. Es bien conocida la capacidad de muchas especies bacterianas de producir toda una gama de metabolitos secundarios que desempeñan funciones tan variadas

como regulación, señalización, comunicación intra e interespecífica o antimicrobiana. Además, son microorganismos muy cosmopolitas capaces de adaptarse a las más diversas condiciones ambientales que se pueden dar en la naturaleza. Todas estas cualidades han fomentado la investigación en el empleo y desarrollo de productos de control biológico basados en especies bacterianas, entre las cuales, las pertenecientes al género *Bacillus* y especialmente *Bacillus subtilis* están recibiendo una excelente acogida (Jacobsen et al., 2004).

La búsqueda y evaluación de bacterias como potenciales microorganismos antagonistas del oídio se desarrolló en varias fases, comenzando con ensayos bajo condiciones controladas en el laboratorio y terminando con la validación de los resultados obtenidos en condiciones reales de cultivo (Imagen 2). La imposibilidad de crecer al oídio en medios artificiales, nos obligó a realizar la preselección de las bacterias antagonistas mediante su enfrentamiento ante diferentes hongos en medio agarizado (Imagen 2a-b), una estrategia sencilla y ampliamente utilizada, pero que adolece de relativa inconsistencia al trasladar los candidatos seleccionados a las condiciones reales de cultivo. De una amplia colección de aislados bacterianos procedentes desde diferentes orígenes, tres de ellos, UMAF6614, UMAF6639 y UMAF8561, fueron elegidos en base a su amplio espectro de acción antifúngica, y posteriormente identificadas como *B. subtilis*. Con el fin de evitar las posibles limitaciones asociadas a la estrategia empleada, estas cepas fueron inicialmente evaluadas por su capa-

cidad intrínseca para inhibir al oídio en ensayos *in vitro* usando hojas de melón cortadas y mantenidas en el sistema de doble placa Petri en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa. Con las bacterias seleccionadas, tanto los tratamientos con células lavadas como con filtrados bacterianos carentes de células redujeron los síntomas de la enfermedad entre un 70-80% respecto a las hojas control no tratadas que mostraron la mayor parte de su superficie cubierta de oídio (Imagen 2c-d). Igualmente, demostraron ser eficaces tanto en aplicaciones preventivas (48 horas antes), como curativas, 24 horas tras la inoculación de las hojas con las esporas de oídio, por lo que mostraban flexibilidad a la hora de desarrollar futuras agendas de aplicación (Romero et al., 2002).

Una vez confirmada la capacidad antagonista intrínseca de las bacterias seleccionadas, se evaluó el efecto de las condiciones ambientales, especialmente la humedad relativa, sobre su eficacia de control, para lo que se llevaron a cabo experimentos con plántulas de melón mantenidas en cámaras de cultivo. En estos experimentos se pudo confirmar que las bacterias se comportaban de forma similar en un amplio rango de humedad (70-90%), aunque como era de esperar, los resultados mejoraban cuando la humedad relativa era superior al 80%. Por tanto, aunque estas cepas bacterianas muestran dependencia por una HR elevada, no es tan acusada como la manifestada por los hongos micoparásitos, que ven fuertemente reducida su actividad antagonista por debajo de este umbral de HR (Romero et al., 2007c).

Plantas jóvenes de primera calidad

Plantel de esqueje

Pelargonium
Bacopa
Impatiens
Petunia
Poinsettia
Verbena

Plantel de semilla

Begonia
Celosia
Cineraria
Ciclamen
Gazania
Impatiens

Semillas

Cutting


vivergal[®]
planteles

Los comienzos son fundamentales

O Vilar, Sta. Mariña do Monte
15560 San Sadurniño, A Coruña
Tel.: 00 34 981 491 196
00 34 981 491 208
ventas@vivergal.com
www.vivergal.com

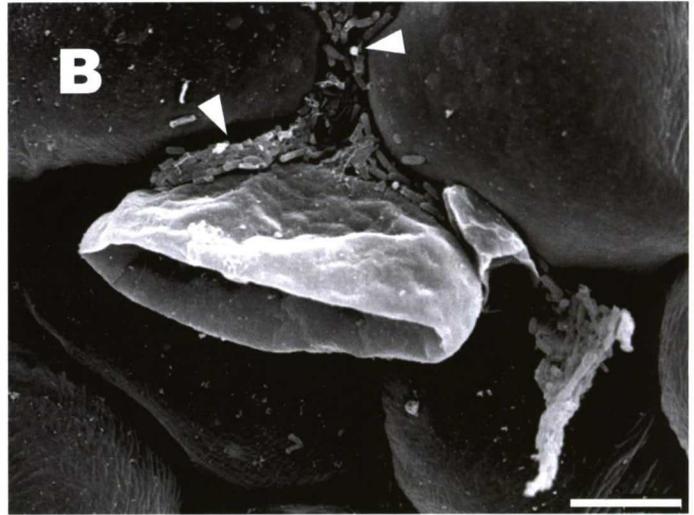
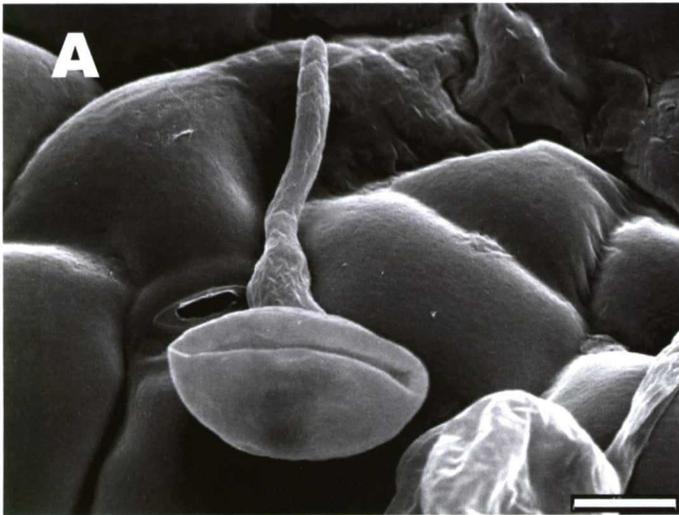


Imagen 3: Fotomicrografías a microscopía electrónica de barrido. (A) Un conidio intacto de *Podosphaera fusca* con una hifa primaria creciendo sobre una planta. En plantas tratadas con *B. subtilis*, las células vegetativas forman microcolonias (cabezas de flecha) especialmente en los espacios de unión entre células epidérmicas y en íntimo contacto con conidios (B) e hifas (C) de *P. fusca*, a los que provoca daños irreversibles y deletéreos. Las barras corresponden a 10 micrómetros.

El mecanismo de acción de los agentes de control biológico, es decir, la manera de interactuar con el patógeno, es una cuestión que ha atraído gran parte de la atención en la investigación sobre el control biológico, ya que de su conocimiento pueden derivarse aplicaciones orientadas a aumentar las posibilidades de éxito y evitar inconsistencias y efectos colaterales no deseados. La estrategia empleada para la selección y los resultados obtenidos en los ensayos frente al oídio, apuntaban a la antibiosis como el principal mecanismo de acción implicado en la actividad de control biológico de estas cepas bacterianas. Durante los diferentes ensayos realizados observamos que la reducción en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad estaba asociada a un descenso equivalente en la tasa de germinación de los conidios del oídio. Hemos demostrado que este efecto deletéreo se debe a la producción

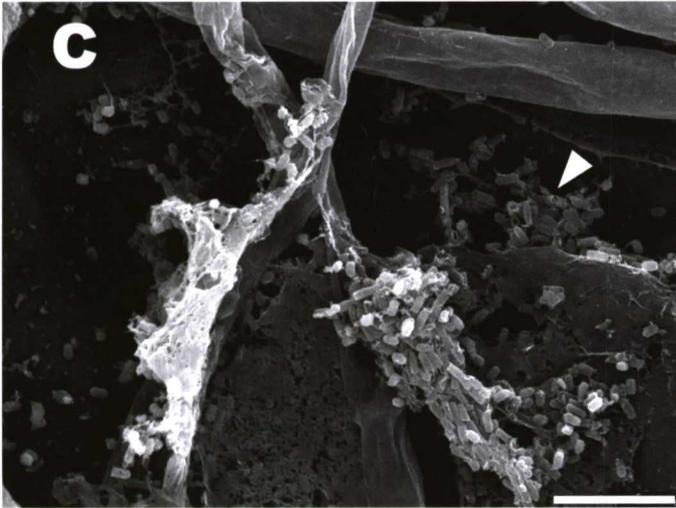
de antibióticos de naturaleza lipopeptídica de la familia de las iturinas, fengicinas y surfactinas por parte de estas cepas de *B. subtilis*. Este grupo de compuestos poseen una estructura característica que los dota de una notable actividad surfactante (capacidad de reducir la tensión superficial del agua) y diferente capacidad microbicida dependiendo de su composición. Entre ellos, hemos confirmado como los lipopéptidos de la familia de las iturinas son especialmente activos frente a *P. fusca*, mientras que las fengicinas parecen desempeñar un papel complementario y las surfactinas no muestran una actividad anti-oídio significativa (Romero et al., 2007b).

La acción tóxica de estos compuestos resulta de la interacción con las membranas de *P. fusca* en las que provoca la formación de poros que desestabilizan su integridad conduciendo irreversiblemente a la

muerte de los conidios y su incapacidad para germinar (Romero et al., 2007a). Este peculiar modo de acción de los lipopéptidos reduce considerablemente el riesgo de desarrollo de resistencias por parte del patógeno, en comparación con los antimicrobianos dirigidos a dianas específicas o pasos muy concretos de rutas metabólicas que, como ya se comentó anteriormente para algunos grupos de fungicidas, pueden ser superados por el patógeno. Por otro lado, se ha demostrado que la acción antimicrobiana de los lipopéptidos puede ser dirigida muy específicamente a grupos de microorganismos mediante la modificación de su estructura y composición química, disminuyendo el riesgo de efectos colaterales indeseados sobre otros organismos. En relación a su acción surfactante, a diferencia de lo que ocurre con sus homólogos sintetizados químicamente, los lipopéptidos de origen bacteriano se van de-

gradando de forma paulatina, llegando a niveles indetectables e inocuos. Todas estas propiedades han conducido a considerar a los lipopéptidos como el grupo más interesante dentro de la nueva generación de antibióticos para ser incluidos en programas de control biológico e integrado, y por extensión los microorganismos que los producen (Ron y Rosenberg, 2001).

El siguiente paso en el desarrollo de un producto comercial a base de un agente de control biológico es confirmar su capacidad de control en condiciones reales de cultivo. En experimentos realizados con plantas de melón en invernaderos a escala semicomercial (Imagen 2e-f) y durante distintos periodos de cultivo (primavera y otoño), las cepas de *B. subtilis* seleccionadas mostraron un excelente comportamiento, ya que en todos ellos se obtuvieron reducciones de la enfermedad similares



a los obtenidos con el fungicida Ortiva (ingrediente activo Azoxystrobin, Syngenta) elegido como testigo. Sin embargo, y como apuntaban los experimentos previos, los mejores resultados correspondieron a los experimentos realizados en otoño, donde se llegaron a registrar reducciones de la enfermedad superiores al 80%. Esta superior capacidad de control se asocia a varios factores citados anteriormente. En primer lugar, a la capacidad de las células bacterianas de producir los lipopéptidos más activos (iturinas y fengicinas) cuando están colonizando la superficie de la planta, a niveles suficientes como para ser detectados analíticamente y afectar el avance de la enfermedad. En estos experimentos se observó un rebrote de la enfermedad 14 días después del primer tratamiento, coincidiendo con la imposibilidad de detectar los lipopéptidos sobre las hojas y con el aumento en el porcentaje de formas de resistencia esporuladas de *Bacillus*, indicando la necesidad de una segunda aplicación que acabó frenando definitivamente el avance de la enfermedad.

En segundo lugar, y no por ello menos importante, a la capacidad de estas cepas para permanecer como células vegetativas durante al menos 12-14 días tras su aplicación, y por tanto con actividad metabólica que soporta la producción de los lipopéptidos y la eficiente colonización de la planta. En este sentido, aunque las bacterias fueron aplicadas de forma uniforme sobre la planta, no se distribuyeron de forma aleatoria sino que formaron microcolonias preferentemente asociadas con conidios y micelio del oídio, a los que indujeron severos daños ultraestructurales (Imagen 3). Además, colonizaron los espacios de unión entre las células epidérmicas donde podrían aprovechar productos secretados y protegerse de las desfavorables y extremas variaciones ambientales propias de las partes aéreas de la planta (Imagen 3b-c). Estas bacterias también producen enzimas tipo amilasas, glucanasas y proteasas, que posibilitarían la utilización de diferentes fuentes de carbono presentes y en paralelo, contribuirían al retraso de la entrada de las células



Calidad,
Experiencia
y Servicio

Nuestra mejor oferta

bacterianas en el estado latente de esporulación. La potente actividad surfactante de los lipopéptidos sobre todo iturina y surfactina, que les permite modificar la hidrofobicidad de las superficies celulares, parece facilitar la movilidad bacteriana y la formación de estas agregaciones celulares ordenadas sobre la superficie de la hoja contribuyendo al control de la enfermedad a largo plazo (Morikawa, 2006).

Una cualidad deseable para un agente de control biológico es su compatibilidad con otras medidas de control, entre ellas los fungicidas químicos más comúnmente usados. Estas bacterias han demostrado ser compatibles con el fungicida Ortiva y aceites comerciales, ya que al ser aplicados de forma alternada no se produce un efecto negativo sobre el tamaño de la población bacteriana, la capacidad de control o la de colonización de las plantas. Al contrario, en algunos casos se ha llegado a registrar un efecto estimulador del crecimiento de la población, probablemente inducido por el mantenimiento de la HR a unos valores que garantizan la disponibilidad de agua y accesibilidad a los nutrientes, y por la presencia de aditivos en estos formulados químicos susceptibles de ser aprovechados por las bacterias. En consecuencia, el uso de estas cepas de *B. subtilis* permitirían reducir el número de aplicaciones de fungicidas y alargar su eficacia y vida media especialmente de aquellos con una única diana como es el caso de los fungicidas QoI (Fernández-Ortuño et al., 2006).

Perspectivas y futuras líneas de acción

Los resultados obtenidos en los estudios realizados hasta el

momento apoyan el potencial de estas cepas de *B. subtilis* como agentes de control biológico frente al oídio de las cucurbitáceas. El comportamiento diferencial en los ensayos de invernadero, aunque no muy acusado, entre las diferentes estaciones del año enfatiza la necesidad de tener en cuenta las condiciones ambientales a la hora de plantear una agenda de aplicaciones con estos agentes de control biológico y la conveniencia de usarlos de forma principal o secundaria para garantizar un comportamiento óptimo. El conocimiento adquirido en todos los ensayos previos recomienda la aplicación de estas bacterias al final de la tarde, para así garantizar un período más largo de HR elevada durante la noche, que facilite la eficiente colonización de las bacterias sobre las plantas tratadas. No obstante, seguimos investigando su eficacia de control para lo que planteamos experimentos con cultivos a escala comercial destinados a optimizar agendas de aplicaciones fiables y reproducibles que integren todos los factores susceptibles, como por ejemplo la HR, de ser modificados a favor del agente de control biológico.

Recientes estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado la capacidad de algunas de estas cepas de *B. subtilis* de potenciar el crecimiento de las plantas de melón (promoción del crecimiento) y activar sus mecanismos de defensa (inducción de resistencia sistémica) contribuyendo a reducciones significativas en la severidad del oídio (García, 2006). Esta forma de actuación mediante la interacción con la raíz de la planta y sin necesidad de entrar en contacto con las superficies aéreas de

la planta ni con el oídio, aumenta las posibilidades de uso de estos agentes de control biológico en cultivos al aire libre, ya que al aplicarlos bien asociados a las semillas o bien en el sistema de riego se reducirían las limitaciones impuestas por las condiciones más desfavorables asociadas a la filósfera. Paralelamente, estos resultados apuntan a que la acción protectora de estos agentes de control biológico es más compleja que la concebida a priori (antibiosis) por lo que seguimos profundizando en el estudio de los mecanismos de acción y el conocimiento de las bases moleculares que orquestan su actividad beneficiosa sobre la planta, con el convencimiento de que nos conducirán a la optimización de su uso.

Con el fin de poder integrar a estos agentes de control biológico en programas de control integrado, es necesario conocer su espectro de acción antimicrobiana. Los ensayos preliminares demostraron una amplia actividad antifúngica, y actualmente se está estudiando su capacidad para controlar otras enfermedades de cucurbitáceas de origen bacteriano. Los ensayos realizados hasta el momento han demostrado una elevada actividad especialmente frente a *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*, agente causal de la mancha bacteriana, o *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, responsable de la podredumbre blanda (Zerrouh, 2005). Igualmente a lo demostrado con el oídio, los antibióticos lipopeptídicos están fuertemente implicados en esta actividad antagonista, aunque no se descartan otras propiedades, como la capacidad de colonización y la exclusión del patógeno.

Todas estas observaciones resaltan el potencial de estas cepas de *B. subtilis* como candidatos idóneos a ser incluidos en programas de control integrado de enfermedades de cucurbitáceas y animan a investigar otras posibles aplicaciones frente a otros patógenos y cultivos. Paralelamente, apoyan la posibilidad de desarrollar un producto comercial fiable de fácil manejo y vida media aceptable. Los primeros pasos destinados a optimizar la producción de células viables, han demostrado que estas cepas pueden ser fácilmente producidas a gran escala y a niveles que garantizan un formulado activo. Estos resultados estimulan a seguir trabajando en aquellos aspectos relacionados con la formulación y con el incremento de la vida media y actividad de estas bacterias sobre las hojas, por ejemplo mediante su combinación con otros aditivos naturales que contribuyan a mejorar su eficacia de control biológico en campo, sostenibilidad y espectro de actividad antimicrobiana (Copping y Menn, 2000; Kiss, 2003).

Bibliografía

- Fravel, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43, 337-359.
- Romero, D., de Vicente, A., Zerrouh, H., Cazorla, F.M., Fernández-Ortuño, D., Torés, J.A., Pérez-García, A. 2007c. Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon. Plant Pathology 56, 976-986.

Para saber más

La bibliografía completa se encuentra en:
www.horticom.com/lucha_integrada