

Fitosanitarios a base de microorganismos: desarrollo y registro.

Utilización de agentes microbianos para el control de enfermedades en la agricultura sostenible: factores que influyen sobre la eficacia de biocontrol

Rafael M. Jiménez Díaz Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Córdoba; e Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC; Córdoba. ag1jdir@uco.es

La aplicación práctica de agentes microbianos para el control biológico de enfermedades de cultivos es limitada por la variabilidad e inconsistencia de los resultados que proporcionan, que son consecuencia de la influencia de factores físicos y químicos del ambiente, y de los componentes de los patosistemas de aplicación, sobre la eficacia de biocontrol. Por ello, el desarrollo de estrategias eficientes de biocontrol de enfermedades requiere que se consideren críticamente la multiplicidad de factores que determinan su éxito, y que la utilización de agentes de biocontrol se conciba como un componente más de programas de control integrado.

INTRODUCCIÓN

Las recientes estimaciones de pérdidas globales de cosecha causadas por enfermedades en los ocho cultivos de mayor significación para la alimentación y la industria (1,2), junto con el resurgimiento (reemergencia) de enfermedades que habían dejado de tener repercusión importante sobre cultivos clave (3,4), indican que para Fitopatología y fitopatólogos permanece la necesidad de innovar y mejorar la eficiencia de las estrategias de lucha contra enfermedades. Un reto adicional sobre dicho cometido concierne a la demanda social de que las acciones y tecnologías que se apliquen para la puesta en práctica de tales estrategias sean respetuosas de la salubridad alimentaria y calidad medioambiental, en el marco de la Agricultura Sostenible; concebida ésta como un sistema integrado de prácticas de producción, que a largo plazo pueda satisfacer las necesidades de alimentos y fibras de la población mediante la utilización eficiente de insumos y tecnologías agrarias, sin comprometer la conservación de los recursos naturales, la calidad del medio ambiente y la competitividad de los productos en los precios y calidades que requiere el comercio internacional (5).

La necesidad y retos arriba señalados inciden particularmente en que el control de las enfermedades que afectan a los cultivos de plantas se lleve a cabo mediante estrategias no-químicas, o que incluyan el mínimo uso de productos fitosanitarios de naturaleza química, para lo cual se ha propuesto la aplicación de estrategias de Control Integrado (CIE; i.e., la utilización combinada o simultánea de todas las medidas de lucha disponibles). De hecho, los programas CIE constituyen uno de los pilares fundamentales de la Agricultura Sostenible, y uno de los componentes preferidos para su configuración son agentes microbianos no patogénicos efectivos en el control de enfermedades (agentes de control biológico, o biocontrol). Aunque dichos agentes pueden alcanzar un nivel suficiente de control por sí solos, su eficiencia resulta potenciada cuando se aplican en combinación con otras medidas de lucha en los programas CIE. En particular, los agentes de biocontrol pueden desempeñar un papel clave en la protección del material vegetal de siembra o plantación libre de inóculo (otra de

las medidas clave en el diseño de programas CIE) contra la infección por patógenos que residen en el suelo e invaden partes subterráneas de la planta (patógenos de suelo).

Gran parte de los esfuerzos realizados hasta ahora en el desarrollo de estrategias de biocontrol se han dirigido a enfermedades causadas por patógenos de suelo, posiblemente porque, a diferencia de los que infectan partes aéreas de la planta, para aquéllos se dispone de menor número de medios de lucha químicos autorizados y eficientes y la variabilidad ambiental del medio edáfico es menos acusada que la del medio aéreo (6). Para dichas enfermedades, la estrategia de biocontrol puede llevarse a cabo mediante la introducción de agentes microbianos en el sistema a través de tratamientos de partes vegetales (semillas, raíces, bulbos, estaquillas, etc.) y/o su incorporación en el suelo; o bien por la estimulación del número y actividad de microorganismos beneficiosos naturales que existen en la mayoría de los suelos agrícolas. En ambos casos, las

PHYTOMA

formas de acción de los agentes de biocontrol incluyen la reducción del inóculo del patógeno o de su potencial de causar enfermedad, la protección de las zonas de infección de la planta, y/o la inducción de resistencia en el huésped.

A pesar del interés social en la utilización preferente de agentes de biocontrol en la lucha contra enfermedades de cultivos, la aplicación práctica de dichos agente en los ambientes agrícolas todavía presenta limitaciones importantes. A nivel mundial, 215 agentes microbianos (incluyendo virus insecticidas) habían sido patentados en el periodo 1986-2001; pero solamente 80 productos de biocontrol se comercializaron en el año 2000. Dichos productos representaron menos del 1% de las ventas de fungicidas (6), e incluyeron especies bacterianas de los géneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, y *Streptomyces*, y especies fúngicas de los géneros *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium*, y *Trichoderma*.

En términos generales, los resultados de la aplicación práctica de agentes de biocontrol de enfermedades adolecen de variabilidad e inconsistencia, lo cual da lugar a que dicha estrategia de control sea percibida por agricultores e industria con menos confianza que los productos químicos fitosanitarios. Dichas inconsistencia y variabilidad resultan de la extensión en que la actividad de los agentes de biocontrol es influida por diversos factores, incluyendo las condiciones ambientales y los componentes de los patosistemas en que son aplicados (7,8,9).

En este trabajo se analizan algunos de los factores que pueden estar implicados en la variabilidad e inconsistencia del biocontrol como estrategia de lucha contra enfermedades de cultivos causadas por patógenos de suelo. El trabajo no pretende ser una revisión bibliográfica del tema, sino que se basa en el análisis de algunos ejemplos seleccionados, con énfasis en Fusariosis Vasculares y Verticilosis.

Influencia de factores del medio físico

La temperatura y características físicas y químicas del suelo han sido destacadas entre los componentes del medio ambiente que determinan la eficacia del biocontrol de enfermedades (10,11).

La influencia de la temperatura puede ser debida tanto a su efecto sobre la actividad del agente de biocontrol como a la extensión en que favorezca el desarrollo de la enfermedad. El ambiente puede no significar desventaja para el agente de biocontrol si la actividad del patógeno es limitada por la misma temperatura que es desfavorable para el agente de biocontrol. Sin embargo, tal situación, favorable para el biocontrol, puede no ser común y en su lugar existan marcadas diferencias entre los óptimos térmicos de agentes de biocontrol y patógeno. Por ejemplo, Harman *et al.* (12) encontraron que el tratamiento de semillas con *Trichoderma hamatum* controló eficientemente la Muerte de Plántulas causada por *Pythium* sp. y *Rhizoctonia* sp. a temperaturas cercanas a las óptimas para el crecimiento del antagonista, pero a temperaturas desfavorables para el crecimiento de los agentes de biocontrol la incidencia de enfermedad en las plantas tratadas no fue diferente del testigo no tratado. Similarmente, Mukherjee y Raghu (13) demostraron que *Trichoderma* sp. no es eficiente en el control de *Sclerotium rolfsii* a temperaturas superiores a 30°C y asignaron la ineficiencia a que la temperatura óptima de crecimiento de *Trichoderma* (25-30°C) es inferior a la del hongo patogénico (30-35°C). En la misma línea, Landa *et al.* (14) encontraron que la eficiencia de biocontrol de la Fusariosis Vascular del garbanzo (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*) por dos aislados de *Pseudomonas fluorescens* es determinada por la favorabilidad de la temperatura para el

desarrollo de la enfermedad, de manera que el control conferido por dichos agente a temperaturas subóptimas (20°C, 30°C) fue anulado a la temperatura óptima para la enfermedad (25°C).

El pH del suelo es otro factor que influye notablemente sobre la eficacia de los agentes de biocontrol de enfermedades. Por ejemplo, la supresión de ataques de *Rhizoctonia solani* en suelos naturales asociada con poblaciones de *Trichoderma* spp. es anulada por pH básico pero se restablece cuando el pH del suelo se ajusta a valores cercanos a 6 (10); y este hecho fue atribuido a la inhibición de la germinación de las conidias de *Trichoderma* spp. por pHs neutros o básicos (15). Similarmente, los ácidos grasos volátiles de cadena corta (C2-C6, acético, butírico capríónico, valérico) emitidos de purines de porcino son efectivos en inhibir la germinación de microesclerocios de *Verticillium dahliae* a pH ácido, pero dicha acción no tiene lugar a pH básico, y ello contribuyó a explicar la variabilidad del biocontrol por los purines según los suelos donde se practicaba la enmienda (16). Por el contrario, la supresión natural de Fusariosis Vasculares asociada con poblaciones de pseudomonas fluorescentes residentes en el suelo efectiva a pH $\geq 8,0$ fue anulada a pH = 6,0 (17).

La complejidad de la influencia de factores del suelo sobre el biocontrol de enfermedades fue resaltada por los resultados de Duffy *et al.* (18), en un estudio sobre la variabilidad en el biocontrol de Mal del Pié del trigo (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) por *T. koningii* en suelos de textura franco limosa en el Noroeste de los EE UU. El biocontrol de la enfermedad estuvo positivamente correlacionado la composición del suelo en Fe, NO₃⁻, B, Cu, Mg soluble, y el porcentaje de arcilla, y negativamente correlacionado con el pH del suelo y el P asimilable; y estas ocho variables explicaron el 95% de la variación total.

Influencia de los componentes del patosistema

Los factores biológicos que determinan el desarrollo de la enfermedad pueden influir significativamente sobre la eficacia de su control por agentes microbianos; y entre ellos merecen ser destacados la densidad y potencial de inóculo del patógeno y la susceptibilidad a la enfermedad en los cultivares del huésped. Resultados de investigaciones en mi laboratorio indicaron que, en condiciones favorables para el desarrollo óptimo de la Fusariosis Vascular del garbanzo, el tratamiento de semillas de los cvs. ICCV 4 y PV 61 con conidias de un aislado no patogénico de *F. oxysporum* aumentó significativamente el periodo de incubación y redujo la cantidad final de enfermedad en suelo infestado con 500 clamidosporas de la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/g de suelo; pero dicho nivel de control fue anulado cuando la densidad de inóculo se incrementó a 1000 clamidosporas del patógeno/g de suelo (19).

En investigaciones subsiguientes, Landa *et al.* (14) estudiaron el potencial de aislados de *P. fluorescens* de la rizosfera de garbanzo para el biocontrol de la Fusariosis Vascular a 20, 25, y 30°C en suelo infestado con 25, 50, 100, 250, 500, o 1.000 clamidosporas de la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*/g de suelo, mediante tratamientos conjuntos de semillas de garbanzo "PV 61" y del suelo con las rizobacterias. Aunque dichos aislados no fueron antagonistas del patógeno in vitro, el tratamiento con ellos redujo el desarrollo de la Fusariosis in vivo. Sin embargo, el efecto de biocontrol sólo se alcanzó con densidades de inóculo iguales o inferiores a 250 clamidosporas del patógeno/g de suelo, y a temperaturas de 20 y 30°C que fueron subóptimas para el desarrollo de la enfermedad. Mercado-Blanco *et al.* (20) también observaron que aislados de *P. fluorescens* de la rizosfera de olivo son eficientes en la protección parcial del

sistema radical de plantones de olivo "Picual" contra la infección por el patotipo defoliante de *V. dahliae*, y que la extensión de supresión de la enfermedad no guardó correlación con la actividad antagonista de dichos aislados contra el patógeno in vitro. Los resultados de ambos estudios indican que la magnitud del biocontrol conferido por agentes microbianos puede ser variable (30-80%) y no necesariamente completa, e inciden sobre otros de los aspectos que contribuyen a las limitaciones prácticas del biocontrol, i.e., la asunción de que el antagonista contra el patógeno in vitro está necesariamente correlacionado con su eficiencia de biocontrol *in vivo*.

Los resultados de Hervás *et al.* (19) anteriores indicaron que, además de la densidad de inóculo del patógeno, también la naturaleza del cultivar de garbanzo influye sobre la eficacia de biocontrol de la Fusariosis Vascular por *F. oxysporum* no patogénico. Así, el nivel de biocontrol fue mayor y más consistente en el cv. PV 61 que en el cv. ICCV 4, aunque ambos cultivares fueron igualmente susceptibles a la enfermedad y su espermosfera y rizosfera resultaron colonizados en similar extensión por el agente de biocontrol. Investigaciones posteriores (21,22) utilizando otros agentes de biocontrol (i.e., *Bacillus subtilis*, *P. fluorescens*, y *T. harzianum*) aplicados individual o conjuntamente a la semilla o a ésta y al suelo en condiciones favorables para el desarrollo de la Fusariosis, confirmaron que la extensión de biocontrol de la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* depende del cultivar de garbanzo, y la eficiencia de biocontrol fue siempre mayor en "PV 61" que en "ICCV 4", independientemente del microorganismo aplicado y de la extensión en que éste colonizó la rizosfera de la planta.

La variación en el nivel de supresión de enfermedad por agentes de biocontrol según los cultivares del huésped también ha sido observada por otros autores. Van Peer *et al.* (23) mostraron que la estirpe WCS417 de *Pseudomonas* sp. redujo más eficientemente la Fusariosis Vascular del clavel en un cultivar moderadamente resistente a la enfermedad que en un cultivar susceptible; y Smith *et al.* (24) encontraron que líneas de tomate con diferente nivel de resistencia a *Pythium torulosum* también difieren en la capacidad de favorecer el biocontrol conferido por *Bacillus cereus* UW85, si bien entre las líneas con menor capacidad se encontraban líneas representativas de los menores y mayores niveles de resistencia. Tales resultados, unidos a los de otros investigadores, han llevado a sugerir que en los cultivares de plantas existen genes que juegan un papel importante en el desarrollo de las interacciones entre plantas y microorganismos beneficiosos, independientemente de los que regulan la reacción de aquéllas a sus patógenos (25).

Conclusiones

Las complejas interacciones planta-patógeno-agente de biocontrol implican que el control biológico de enfermedades puede ser fuertemente influido por una variedad de factores de los componentes de los patosistemas, que determinan la variabilidad e inconsistencia con que el biocontrol es percibido por agricultores, técnicos e investigadores cuando dichos agentes se aplican en escenarios agrícolas reales. Por ello, el desarrollo de estrategias efectivas para tal fin requiere que la multiplicidad de factores determinantes del éxito de biocontrol sean considerados críticamente; y para el uso eficiente de los agentes de biocontrol es aconsejable que se les conciba como partes integrantes de programas CIE y esté soportado por el conocimiento de los patosistemas propios de profesionalidad fitopatológica de los técnicos que lo realicen.

Puesto que la eficacia de los agentes de biocontrol en reducir la cantidad de enfermedad disminuye a medida que las condiciones en el patosistema favorecen el desarrollo de aquélla (14), se ha sugerido que la evaluación de dicha eficacia se realice mediante análisis de estabilidad de un conjunto de experimentos, basado en índices ambientales relacionados con el desarrollo de enfermedad, más que en experimentos individuales (26).

La importancia de la densidad de inóculo del patógeno y la dosis del agente de biocontrol introducida en el patosistema para el éxito del control biológico de enfermedades, ha llevado a varios investigadores a desarrollar modelos que relacionen a ambas variables y permitan realizar predicciones sobre el intervalo de dosis del agente necesaria para proporcionar control eficiente, reproducible y económico (27,28). Los parámetros en algunos de dichos modelos pueden permitir comparar la eficacia relativa de los agentes de biocontrol contra diferentes patógenos, así como la de diferentes agentes contra un patógeno determinado (28).

Finalmente, que el genotipo del huésped puede favorecer o contrarrestar el la eficiencia de biocontrol de agentes microbianos introducidos en los sistemas de cultivo, abre nuevas e inesperadas dificultades respecto de la eficacia de aquéllos. Es más, resultados relativamente recientes demuestran que el cultivar de la planta huésped o la secuencia de cultivos en un suelo agrícola, pueden determinar el establecimiento predominante de poblaciones microbianas (*F. oxysporum* no patogénico, *pseudomonas* fluorescentes, etc.) implicadas en el biocontrol en suelos supresivos de enfermedades (29,30,31).

BIBLIOGRAFÍA

1. OERKE, E.-C. Y DEHNE, H.-W. 2004. *Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection*. Crop Prot. 23: 275-285.
2. OERKE, E.-C., WEBER, A., DEHNE, H.-W., Y SCHÖNBECK, F. 1994. *Conclusions and perspectives*. Pgs. 742-770 en: E.-C. Oerke, H.-W. Dehne, F. Schönbeck, y A. Weber (eds). Crop Production and Crop Protection. Elsevier, Amsterdam.
3. FRY, W.E., Y GOODWIN, S.B. 1997. *Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States*. Plant Dis. 81: 1349-1357.
4. MACMULLEN, M.P., JONES, R., Y GALLENBERG, D. 1997. *Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact*. Plant Dis. 81: 1340-1348.
5. JIMÉNEZ DÍAZ, R.M., Y LAMO DE ESPINOSA, J. (eds.). 1998. *Agricultura Sostenible*. Mundi-Prensa Libros. Madrid.
6. PAULITZ, T.C., Y BÉLANGER, R.R. 2001. *Biological control in greenhouse systems*. Annu. Rev. Phytopathol. 39: 103-133.
7. BECKER, J.O., Y SCHWINN, F.J. 1993. *Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook*. Pest. Sci. 37: 355-363.
8. BAKER, R. 1986. *Biological control: an overview*. Can. J. Plant Pathol. 8: 218-221.
9. BOLAND, G.J. 1990. *Biological control of plant diseases with fungal antagonists: challenges and opportunities*. Can. J. Plant Pathol. 12: 295-299.
10. BAKER, R., Y SCHER, F.M. 1987. *Enhancing the activity of biological control agents*. Pgs. 1-17 en: Innovative Approaches to Plant Disease Control. John Wiley of Sons,

Nueva York.

11. **COOK, R.J.** 1992. *A customized approach to biological control of wheat root diseases*. Pgs 211-222 en: E.C. Tjamos, G.C. Papavizas, y R.J. Cook (eds.). *Biological Control of Plant Diseases*. Plenum Press, Nueva York.
12. **HARTMAN, G.E., CHET, I., y BAKER, R.** 1981. *Factors affecting Trichoderma hamatum applied to seeds as a biocontrol agent*. *Phytopathology* 71: 569-572.
13. **MUKHERJEE, P.K., y RAGHU, K.** 1997. *Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potencial of Trichoderma sp. on Sclerotium rolfsii*. *Mycopathologia* 139: 151-155.
14. **LANDA, B.B., NAVAS-CORTÉS, J.A., HERVAS, A., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.** 2001. *Influence of temperature and inoculum density of Fusarium oxysporum f. sp. ciceris on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria*. *Phytopathology* 91: 807-816.
15. **CHET, I., y BAKER, R.** 1980. *Indication of suppressiveness to Rhizoctonia solani in soil*. *Phytopathology* 70: 994-998.
16. **TENUTA, M., CONN, K.L., y LAZAROVITS, G.** 2002. *Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill microsclerotia of Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92: 548-552.
17. **SCHER, F.M., y BAKER, R.** 1980. *Mechanisms of biological control in a Fusarium suppressive soil*. *Phytopathology* 70: 412-417.
18. **DUFFY, B.K., OWNLEY, B.H., y WELLER, D.M.** 1997. *Soil chemical and physical properties associated with suppression of take-all of wheat by Trichoderma koningii*. *Phytopathology* 87: 1118-1124.
19. **HERVAS, A., LANDA, B.B., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.** 1997. *Influence of chickpea genotype and Bacillus sp. on protection from Fusarium wilt by seed treatment with non-pathogenic Fusarium oxysporum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 631-642.
20. **MERCADO-BLANCO, J., RODRIGUEZ-JURADO, D., HERVAS, A., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.** 2004. *Suppression of Verticillium wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescens Pseudomonas spp.* *Biological Control*. 30: 474-486.
21. **HERVAS, A., LANDA, B.B., DATNOFF, L.E., y JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.** 1998. *Effects of commercial and indigenous microorganisms on Fusarium wilt development in chickpea*. *Biological Control* 13: 166-176.
22. **TEJEDOR, E.M.** 2000. *Efecto del genotipo de garbanzo sobre el control biológico de la Fusariosis Vascular por Pseudomonas fluorescens y Fusarium oxysporum no patógeno*. Trabajo Profesional Fin de Carrera, ETSIAM. Universidad de Córdoba, Córdoba.
23. **VAN PEER, R., NIEMANN, G.J., y SCHIPPERS, B.** 1991. *Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by Pseudomonas sp. strain WCS417r*. *Phytopathology* 81: 728-734.
24. **SMITH, K.P., HANDELSMN, J., y GOODMAN, R.M.** 1997. *Modeling dose-response relationships in biological control: partitioning host responses to the pathogen and biocontrol agent*. *Phytopathology* 87: 720-729.
25. **SMITH, K.P., y GOODMAN, R.M.** 1999. *Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 473-491.
26. **BOLAND, G.J.** 1997. *Stability analysis for evaluating the influence of environment on chemical and biological control of white mold (Sclerotinia sclerotiorum) of bean*. *Biological Control* 9: 7-14.
27. **JOHNSON, K.B.** 1994. *Dose-response relationships and inundative biological control*. *Phytopathology* 84: 780-784.
28. **MONTESINOS, E., y BONATERRA, A.** 1996. *Dose-response models in biological control of plant pathogens: an empirical verification*. *Phytopathology* 86: 464-472.
29. **HOPKINS, D.L., LARKIN, R.P., y ELMSTROM, G.W.** 1987. *Cultivar specific induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt of watermelon*. *Phytopathology* 77: 607-611.
30. **LARKIN, R.P., HOPKINS, D.L., y MARTIN, F.N.** 1993. *Effect of successive watermelon plantings on Fusarium oxysporum and other microorganisms in soil suppressive and conducive to Fusarium wilt of watermelon*. *Phytopathology* 83: 1097-1105.
31. **LANDA, B.B., MAVRODI, O.V., RAAIJMAKERS, J.M., McSPADDEN, B.B., THOMASHOW, L.S., y WELLER, D.M.** 2002. *Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing Pseudomonas fluorescens strains to colonize the roots of pea plants*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3226-3237.