Trichoderma asperellum cepa T34: Nuevo fitosanitario biológico aprobado en Europa

Mª Isabel Trillas (Professor Titular Fisiologia Vegetal. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Socio y Asesor Científico Biocontrol Technologies SL).
Eva Casanova (Investigador y Responsable Registro, Biocontrol Technologies SL).
Manuel Avilés (Catedrático Escuela Universitaria. Departamento de Ciencias Agroforestales.E.T.S.I.A. Universidad de Sevilla. Socio y Asesor Científico Biocontrol Technologies SL).

Esta comunicación versa sobre el proceso de desarrollo de un agente de control biológico (*Trichoderma asperellum* cepa T34), desde su aislamiento en la Universidad de Barcelona, su desarrollo por Biocontrol Technologies S. L., su inclusión en Europa, bajo el Reglamento 1107/2009 y en Estados Unidos (EPA) hasta el inicio de su comercialización.

La primera definición de **control biológico** propuesta por Baker y Cook 1974 define como control biológico "*la reducción de densidad de inoculo o de aquellas actividades de un patógeno /parásito en su estado activo o de dormición, por uno o más organismos, llevada a cabo de forma natural o a través de la manipulación del ambiente, huésped o antagonista o por la introducción masiva de uno o más antagonistas*" (Cook y Baker, 1983). En esta publicación el control biológico se plantea con un enfoque de **manejo integrado**, así indica que "*el control biológico puede llevarse a cabo a través de prácticas culturales que crean un ambiente favorable a los antagonistas, la resistencia de la planta huésped o ambos; a través de la mejora de plantas que mejoren su resistencia hacia el patógeno o la idoneidad de la planta huésped a las actividades de los antagonistas; a través de la introducción masiva de antagonistas, cepas no patogénicas o otros agentes u organismos beneficiosos*". El primer intento satisfactorio de inocular hongos antagonistas lo llevó a cabo Hastley en 1921 "la competencia por diferentes hongos es un factor a tener en cuenta,… la inoculación de suelo tratado con saprofitos puede algunas veces mejorar la eficacia a la desinfección por calor".

En la literatura científica a lo largo de estos años encontramos un gran número de estudios sobre los microorganismos beneficiosos, detallando: i) los métodos de selección, e identificación (ecológica, morfológica y molecular); ii) eficacia en condiciones de invernadero y campo, iii) producción de toxinas, antibióticos, enzimas,… substancias del metabolismo secundario, iv) los modos de acción muy dirigidos al principio sobre los fenómenos de parasitismo y antibiosis (metabolitos secundarios), así como por la competencia por nutrientes (macro y micronutrientes) y espacio (rizosfera) y más recientemente por dilucidar su papel sobre las plantas activando su metabolismo de defensa. La información es mucho menor sobre el desarrollo de formulaciones, métodos de fabricación y de aplicación, que evidentemente está en manos de las empresas.

En Europa, el control biológico de las enfermedades de las plantas se encuentra en su inicio, si bien su desarrollo ha sido inferior que en USA, si se compara por el número de productos comerciales registrados, alrededor de un centenar en USA *vs* alrededor de treinta en EU (Alabouvette *y col.* 2006, http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/ public/index.cfm). Este balance debería cambiar en los próximos años ya que en Europa la agricultura ecológica ha incrementado mucho y ha influido sobre el desarrollo del control biológico (Eilenberg, 2006). Además, la opinión pública

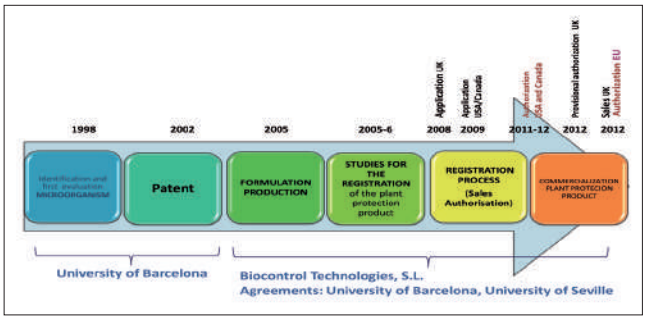

Figura 1. Proceso de desarrollo de una nueva materia activa *Trichoderma asperellum* cepa T34, el fungicida biológico T34 Biocontrol®.

puede condicionar la actividad productiva, de esta forma el método de producción (tecnología) incide sobre el consumidor, que puede tener una actitud positiva o negativa sobre la elección de un alimento (Ritson y Kuznesof, 2006). Las preferencias del consumidor sobre la producción de alimentos que usan tecnologías basadas en el control biológico, control integrado de las enfermedades y plagas es una percepción positiva de alimento "saludable", alimento "orgánico" alimento "libre de…". Esta preocupación de los europeos (consumidores y productores) sobre el papel negativo en la salud y el medio ambiente de muchas substancias químicas autorizadas en agricultura, ha incidido sobre legisladores. Como ejemplos tenemos la **Regulación 396/2005** aplicable desde el año 2008 en donde se revisan los límites máximos de residuos (no aplicable a microorganismos ni extractos vegetales) y en la **Directiva 91/414/EEC** y posterior **Regulación 1107/2009**, cuyos objetivos fueron revisar y armonizar los productos fitosanitarios en Europa, posteriormente con la **Directiva 2009/128/ECC** sobre el control integrado de plagas y enfermedades que se implementará en EU el año 2014. El objetivo principal de esta Directiva es el uso sostenible de plaguicidas mediante la reducción de riesgos para la salud y el medio ambiente y el fomento de la gestión integrada o técnicas alternativas no químicas.

No se puede decir que por el hecho de que un microorganismo ha sido aislado de la naturaleza no presenta un peligro, por tanto el Registro Fitosanitario debe de

ser obligado previo a la comercialización de materias activas de origen biológico. Se deben caracterizar los peligros y evaluar los daños, aunque con diferencias ya que se trata de productos diferentes.

En Europa el desarrollo de un fitosanitario biológico es una tarea más compleja que en USA aunque el "grueso" de estudios sea el mismo (test recomendados mayoritariamente por la OECD) para casi todos los países: Europa, USA, Canadá, Australia, etc. Estos estudios contemplan una precisa identificación y caracterización de la materia activa (microorganismo) a nivel de cepa, también se deben satisfacer los estudios de toxicidad que demuestren el no efecto sobre la salud humana (oral, dérmica, por inhalación, ingestión, intratraqueal, intraperitoneal, etc.). Además, se debe demostrar su no-efecto sobre los organismos que no son objetivo, es decir inocuidad sobre el medio ambiente aéreo, acuático y terrestre (abejas, artrópodos no diana, varios organismos acuáticos, gusanos, plantas superiores, etc.). En Europa, a diferencia de USA, se requiere demostrar la eficacia del producto formulado, en diversas regiones geográficas, durante un mínimo de dos años consecutivos y además la autorización es para un uso (enfermedad) y un cultivo específico. Aunque es importante demostrar la eficacia del producto, estos aspectos conllevan una dilatación muy importante en su tiempo de desarrollo y un coste muy elevado. Otro aspecto que prolonga el desarrollo de un fitosanitario biológico en Europa es el hecho de los requerimientos ante las distintas administraciones, aspecto que se pretende mejorar con la Regulación 1107/2009, pero que podría mejorar substantivamente si la evaluación estuviese centralizada como lo está en USA, por la agencia de protección ambiental (EPA).

Además, algunos de los aspectos que demoran en Europa el registro biológico, es la falta de experiencia en este tipo de registros por parte de los evaluadores y la aplicación directa de una Directiva desarrollada para moléculas químicas que no se adapta a los microorganismos, como por ejemplo con estudios como i) "desaparición de un producto biológico en el ambiente", si no es nocivo un producto biológico, que se ha demostrado con otros estudios su inocuidad, ¿qué sentido tiene que deba degradarse como se le exige a un químico? Los horticultores están encantados con su permanencia; ii) la especificidad que se exige para cada cultivo (familias de cultivos), los microorganismos beneficiosos no producen toxicidad en unos cultivos sí y en otros no como algunas substancias químicas, iii) sobre la eficacia en distintas zonas climática, ¿porqué no dejamos que los agricultores europeos decidan, como los agricultores americanos, qué productos son más eficaces y cuáles no, una vez demostrada una eficacia básica? Todo ello conlleva en Europa a una situación de existencia para los microorganismos de "mercado negro", con el riesgo que ello implica sobre concentraciones (que va en detrimento de la eficacia), formulaciones (que de nuevo inciden sobre una peor eficacia), falta de pruebas de toxicidad, falta de clasificación y caracterización de microorganismos (que quiere decir riesgo). Esto, en definitiva, perjudica al horticultor y al mercado de los fitosanitarios biológicos en su conjunto.

El desarrollo de *Trichoderma asperellum*, cepa T34 podríamos decir que ha seguido un proceso "ortodoxo" (Figura 1): surge de la investigación básica llevada a cabo en la Universidad de Barcelona (1998-1999), se aísla a partir de un compost altamente supresivo contra *Fusarium oxysporum* en tomate, en el transcurso del desarrollo de una tesis doctoral (Cotxarrera *y col*. 2002, Trillas y Cotxarrera, 2002). Se efectúa la correspondiente solicitud de patente, primero en España (ES 2 188 385 B1), que luego se extiende a EU y USA (EP 1 400 586 B1, US 7,554, 657 B2). Se realiza una nueva tesis doctoral en donde una parte de la investigación se centra en el estudio de mecanismos de acción (Segarra *y col*. 2007, 2009, 2010).

En el año 2005, se inicia la actividad de la empresa (*spin off* de la UB) para el desarrollo y registro del producto, se incorpora personal de la Universidad de Sevilla y se efectúa la contratación de personal que llevará a cabo unos 100 estudios y supervisará unos 40 estudios contratados a empresas acreditadas, lo que permitirá en el año 2009 presentar la solicitud de registro en UK, con la aceptación de documentación completa (2010). La evolución del proceso de registro continúa y se efectúa su seguimiento y respuesta a las cuestiones de las autoridades, quienes elaboran el Draft Assessment Report en 2011. Con fecha enero de 2012 se obtiene la autorización provisional en UK (país *reporter*), antes de ser emitidas las conclusiones de la EFSA (abril 2012), y posteriormente es aprobado por la Comisión Europea con su publicación correspondiente en diciembre de 2012 (**Reglamento de Ejecución de la Comisión num. 1238/2012**). Actualmente nos encontramos en la fase de re-registro, reconocimiento mutuo y ampliaciones de usos en diversos países.

En USA la autorización de registro se puede obtener en 2 años mientras que en Europa es superior a 6 años, nuestro microorganismo es uno de los que se ha evaluado de forma rápida y prácticamente sin deficiencias. El desarrollo de agentes de control biológico generalmente está vinculado a Universidades y Centros de Investigación, acostumbrados a la investigación teórica y aplicada y con alto conocimiento técnico científico, cuyos modelos de transferencia se realizan por venta/licencia de patente y/o con la creación de *spin off*. En Europa el proceso (coste y duración) es especialmente difícil para las pequeñas empresas y en España se le añaden a esta dificultad el hecho que la propia administración no actúe como país *reporter* en solicitudes de este tipo, la escasa especialización de los fondos de inversión, la falta de capital de sustitución, la poca /nula experiencia en I+D de muchas empresas del sector, etc. En Europa, sólo en el Reino Unido, en este momento, el producto se puede comercializar después de 14 años desde su aislamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Alabouvette, C., Olivian, C., Steinberg, C. (2006). *Biological control of plant diseases: The European situation*. European Journal of Plant Pathology 114:329-341.

Cook J.R., Baker, K.F. (1983) *The Nature and Practice of biological Control of Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society.

Cotxarrera, L., Trillas, M.I., Steinberg, C., Alabouvette, C. (2002). *Use of sewage sludge compost and* Trichoderma asperellum *isolates to suppress Fusarium wilt of tomato*. Soil Biology 6 Biochemistry 34: 467-476.

Eilenberg, J. (2006) *Concepts and visions of biological control*. Capítulo 41 J.Eilenberg and H.M.T. Hokkamen (edt) An ecological and societal approach to biological control 1-11.

Ritson, C., Kuknesof, S. (2006) *Food consumption, risk perception and alternative production technologies*. Capítulo 4. J.Eilenberg and H.M.T. Hokkamen (edt) An ecological and societal approach to biological control 47-64.

Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M.A. Oliveira, E. Trillas, I. (2007). *Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with* Trichoderma asperellum, *strain T34*. Proteomics 7:3943-3952.

Segarra, G., Van der Ent, S., Trillas, I., Pieterse, C.M.J. (2009). *MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe*. Plant Biology 11:90-96.

Segarra, G., Casanova, E., Aviles, M., Trillas, I. (2010). Trichoderma asperellum *strain T34 Controls Fusarium Wilt Disease in Tomato Plants in Soilless Culture Through Competition for Iron*. Microbial Ecology 59:141-149.

Trillas, M.I., Cotxarrera, L. (2002) *Substrates containing a* Trichoderma asperellum *strain for biological control of* Fusarium *and* Rhizoctonia. Patente WO 03/000866 A1.