



**Daranas, N.;  
Bonaterra, A.;  
Badosa, E; Roselló, G;  
Francés, J; Ramos, M.;  
Montesinos, E.**

Centro de Innovación y  
Desarrollo en Sanidad  
Vegetal (CIDSAV) -  
Instituto de Tecnología  
Agroalimentaria  
(INTEA) - Universitat de  
Girona

## Nuevos productos de biocontrol frente a enfermedades fúngicas de vid, albaricoquero y melocotonero

El proyecto Interreg POCTEFA PALVIP (Protección Alternativa de las Producciones Vegetales Interregional Pirineos) propone un enfoque innovador en el estudio de soluciones de biocontrol para la gestión de cultivos vegetales en el entorno mediterráneo. En él se plantea la formulación de nuevos productos biológicos, el análisis de sus mecanismos de acción y la respuesta inducida en la planta, así como el estudio de su impacto organoléptico, sanitario y ambiental. Se contempla la puesta a punto y la producción de los productos, así como los trabajos de experimentación en campo. Entre los productos a ensayar se encuentran extractos vegetales como EqUr, Akivi y Akiplex y bacterias como agentes de biocontrol. En este proyecto participan la Universitat de Girona (UdG), la Chambre d'Agriculture des Pyrénées Orientales (CA66), l'Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI), la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), l'Universitè de Perpignan Via Domitia (UPVD), Futureco Bioscience (FBIO) y, como empresas asociadas, AKINAO y AMP Biotech.

La Universitat de Girona prepara y proporciona prototipos de dos nuevos bioplaguicidas microbianos basados en *Bacillus amyloliquefaciens* y *Lactobacillus plantarum* para los ensayos de campo. Actualmente se dispone de resultados del impacto ambiental de los dos productos que nos permiten conocer las dinámicas poblacionales de los dos agentes de biocontrol en los distintos cultivos.

En el ámbito mediterráneo, la vid y los frutales de hueso son cultivos de gran importancia económica que se ven afectados por diversas enfermedades con elevada relevancia como el oídio, el mildiu y la podredumbre gris en la vid, y la moniliosis en albaricoquero y melocotonero. En el contexto actual se está produciendo una reducción de los productos fitosanitarios autorizados en el control de enfermedades fúngicas y bacterianas en dichos cultivos (Directiva 2009/128/CE), por lo que sustancias o microorganismos de origen natural constituyen una tecnología con grandes perspectivas en la protección vegetal.

Entre los productos de control biológico se incluyen extractos vegetales, microorganismos beneficiosos o los compuestos derivados de su metabolismo, que son ingredientes activos capaces de limitar la población o el impacto de agentes fitopatógenos (Glare y col., 2012). En la Unión Europea estos productos de biocontrol están sujetos a la misma regulación que los plaguicidas sintéticos (Reglamento 2009/1107 y 2017/1432). Aun así, las directrices propuestas por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) o la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (European Commission Health & Consumer Protection Directorate - General SANCO/11470/2012-rev. 8, 2014) no proponen un protocolo estándar para la detección de residuos o para la determinación de su impacto ambiental.

### Nuevos productos de biocontrol

Los prototipos más avanzados de productos de biocontrol que se de-



Figura 1. Uvas, melocotones y albaricoques (de izquierda a derecha) utilizados en los ensayos de eficacia *ex vivo* para la evaluación de los prototipos de los productos de biocontrol.

sarrollan en la Universitat de Girona contienen como ingrediente activo bacterias que pertenecen a las especies microbianas *Bacillus amyloliquefaciens* (*Bacillus* UdG) (Mora y col., 2015) y *Lactobacillus plantarum* (*Lactobacillus* UdG) (Roselló y col., 2013, Daranas y col., 2019).

En el proyecto PALVIP se prepararon nueve prototipos de *Lactobacillus* UdG y seis prototipos de *Bacillus* UdG con los que se realizaron ensayos en condiciones controladas de laboratorio para seleccionar los mejores prototipos en base a la viabilidad del agente de biocontrol, la capacidad de adaptación a condiciones de estrés biótico, así como la supervivencia en hojas y flores. Los resultados de los ensayos permitieron seleccionar dos prototipos de cada producto para la realización de ensayos de eficacia *ex vivo* frente a los patógenos de interés. Como se observa en la Figura 1, se realizaron ensayos para el control de *Botrytis cinerea* en uva y *Monilinia laxa* en albaricoquero y melocotonero. Se seleccionó un prototipo de cada producto para la realización de los posteriores ensayos en campo.

### Ensayos de eficacia en campo

Los ensayos se realizan en fincas experimentales de albaricoquero y melocotonero en el Rosellón (Francia) por la Chambre d'Agriculture des Pyrénées Orientales (CA66) y en fincas comerciales de vid en el Penedés (España) por l'Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI). Los productos se aplican mediante pulverización a las mismas dosis que los agentes de biocontrol comerciales y siguiendo las pautas de tratamiento establecidas para los distintos fitosanitarios en cada cultivo. En la Figura 2 se muestran, a modo de ejemplo, los ensayos. En éstos se incluyeron controles no tratados, productos de síntesis de referencia y agentes de control biológico comerciales, en el caso que hubiera alguno autorizado para ese cultivo. Los primeros ensayos fueron realizados durante la campaña 2018, a partir de los cuales se obtuvo que los nuevos productos de biocontrol presentaban distintas eficacias. Se observó que la modificación de las pautas de tratamiento, así como de las dosis empleadas, podría mejorar la eficacia en campo



Figura 2. Albaricoquero, melocotonero y vid (de izquierda a derecha). Cultivos utilizados en los ensayos de eficacia en campo para la evaluación de los prototipos de los productos de biocontrol.

utilizando una estrategia de protección integrada. Estas mejoras se han llevado a cabo en los ensayos de la campaña actual y se prevé disponer de los resultados de eficacia en el control antes de finalizar el año 2019.

### Evaluación del impacto ambiental y sanitario

Los productos de control biológico presentan un perfil ecotoxicológico más favorable que los productos fitosanitarios de síntesis. Aun así, es necesario realizar estudios específicos para cada agente de biocontrol en particular. Estos estudios tienen como objetivo garantizar la ausencia de efectos adversos del ingrediente activo y del producto formulado en plantas y animales, incluyendo humanos. También es necesario realizar estudios de trazabilidad, de residuos y de impacto ambiental (Montesinos, 2003). Por lo tanto, el desarrollo de métodos de monitorización que detecten e identifiquen un agente de biocontrol microbiano a nivel de cepa, que lo distinguen de la población autóctona en el ambiente, y permitan la trazabilidad de la dinámica de la población a lo largo del tiempo, es imprescindible en su desarrollo.

Los métodos de monitorización de los nuevos productos de biocontrol se han desarrollado utilizando herramientas moleculares. Inicialmente se procedió a la identificación de dos marcadores moleculares específicos para cada una de las cepas, *Bacillus* UdG y *Lactobacillus* UdG (se incluyó también la cepa *Bacillus subtilis* QST713 como ingrediente activo del producto comercial Rhapsody® que se utiliza en varios ensayos como producto de referencia). Después de determinar la especificidad de los marcadores para cada cepa, se procedió a optimizar el protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la modalidad cuantitativa de viables, utilizando el reactivo PEMA<sup>®</sup>.

Actualmente se dispone de los resultados de los ensayos en campo en flores y frutos inmaduros de albaricoque, así como en hojas y frutos en vid, tal y como se observa en las Figuras 3 y 4 respectivamente. Los ni-

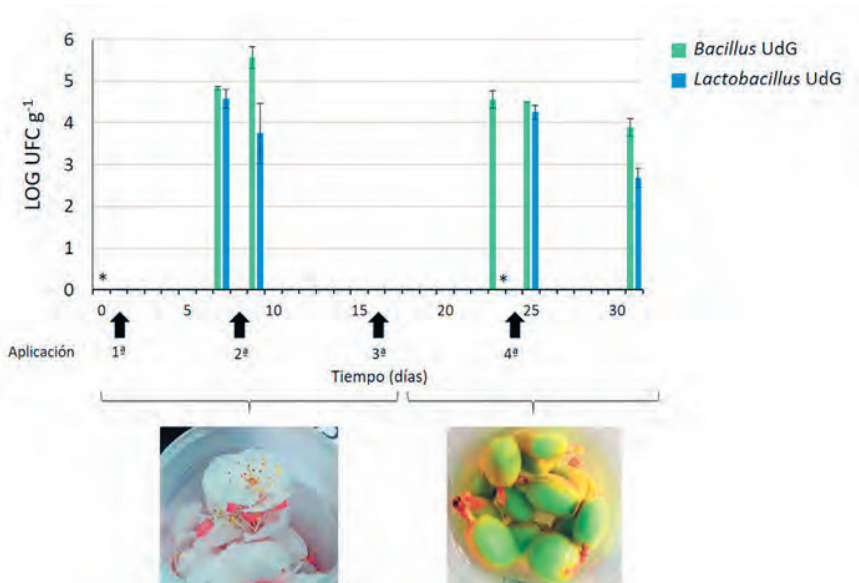


Figura 3. Monitorización de la viabilidad en campo de los productos de biocontrol *Bacillus* UdG y *Lactobacillus* UdG en flores y frutos inmaduros de albaricoque. \* indica no detectado.

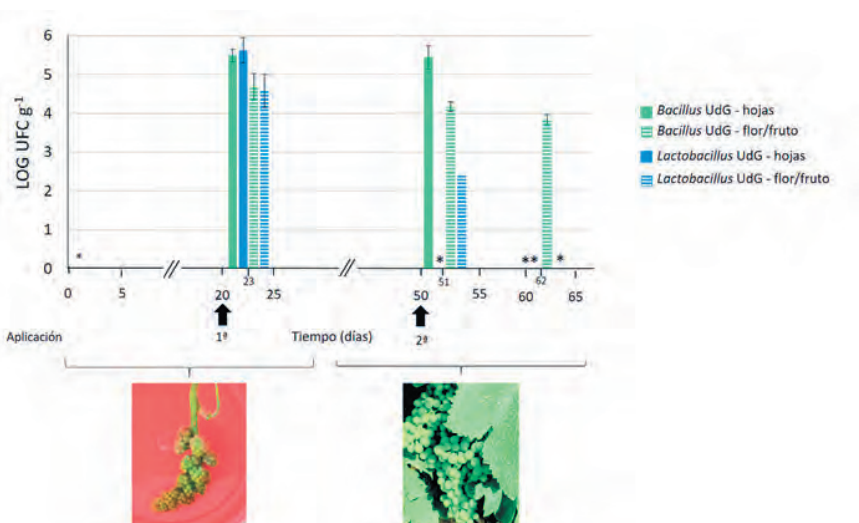


Figura 4. Monitorización de la viabilidad en campo de los productos de biocontrol *Bacillus* UdG y *Lactobacillus* UdG en hojas y flores/frutos de vid. \* indica no detectado.

veles poblacionales que se alcanzan justo después de las aplicaciones con los dos productos de biocontrol son suficientes para una actividad óptima. Sin embargo, se observan diferencias entre los dos productos debido a las condiciones climáticas en el momento en que se realizan los ensayos (albaricoque durante los meses de febrero y marzo y en vid durante los meses de mayo y julio). Su viabilidad se ve afectada de manera diferencial entre los dos agentes de biocontrol tras 7-12 días de las aplicaciones, observándose una mayor supervivencia de *Bacillus* UdG.

### Análisis de la respuesta de la planta

Conocer cuál es la respuesta de la planta a los tratamientos con los nuevos productos de biocontrol ayudará a identificar también los genes que se inducen en ésta y que pueden estar implicados en el control de la enfermedad, además de la acción directa del producto sobre el patógeno. El estudio se lleva a cabo mediante análisis transcriptómico por secuenciación masiva de los RNAm expresados (RNAseq) tal y como se muestra en la Figura 5. Como resultado del análisis se identifican los

genes sobre-expresados y reprimidos en la planta tras el tratamiento con el producto de biocontrol, en comparación con el control no tratado. Finalmente, se realiza la validación de los resultados mediante PCR cuantitativa y se seleccionan aquellos genes que presenten una correlación entre las dos técnicas y que estén implicados en los mecanismos de defensa de la planta. Este conjunto de genes nos proporciona una herramienta de análisis para poder determinar pautas de tratamiento y dosis de aplicación de los productos. Se espera que los resultados obtenidos en este proyecto repercutan en el desarrollo y registro de estos nuevos productos de biocontrol para el manejo de las enfermedades fúngicas de gran impacto en cultivos de vid y frutales de hueso.

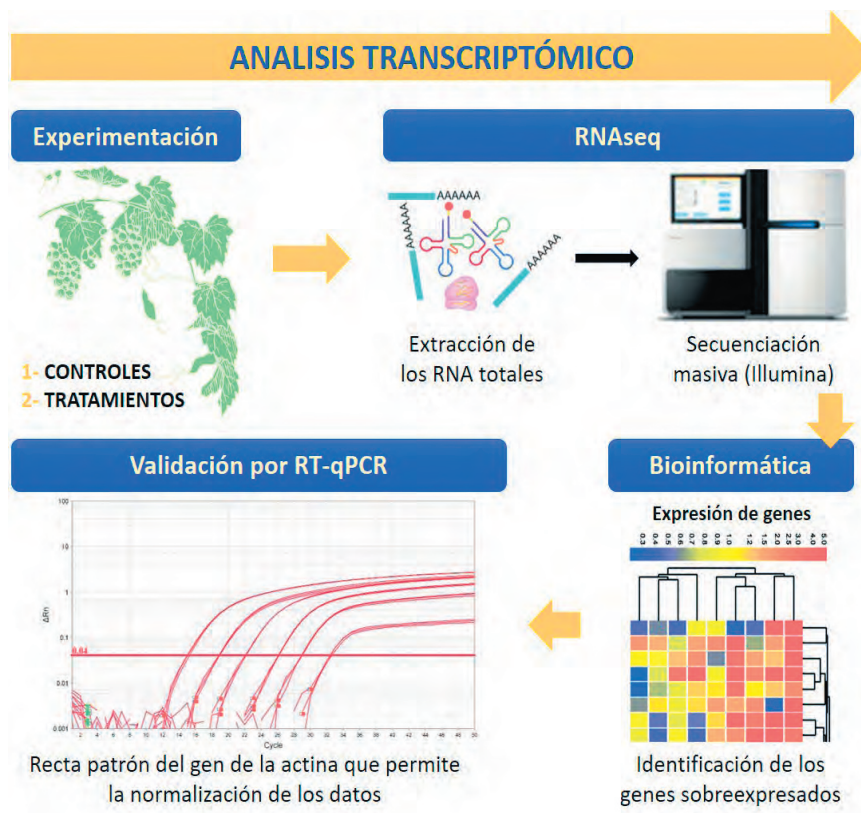


Figura 5. Esquema simplificado del procedimiento para el análisis de la respuesta de la planta mediante estudios transcriptómicos.



El proyecto ha sido cofinanciado al 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) en el marco del Programa Interreg V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2014-2020).

## Bibliografía

- Daranas N., Roselló G., Cabrefiga J., Donati I., Francés J., Badosa E., Spinelli F., Montesinos E., Bonaterra A. 2019. Biological control of bacterial plant diseases with *Lactobacillus plantarum* strains selected for their broad-spectrum activity. *Annals of Applied Biology*, 174, 92-105.
- Glare T., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani n., Rgen J., Hi K., Marrone P., Morin L., Stewart A. 2012. Have biopesticide come of age? *Trends in Biotechnology*, 30, 250-258.
- Montesinos E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*, 6, 245-252.
- Mora I., Cabrefiga J., Montesinos E. 2015. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. *PLoS ONE*, 10, e0127738.
- Roselló G., Bonaterra A., Francés J., Montesinos L., Badosa E., Montesinos E. 2013. Biological control of fire blight of apple and pear with antagonistic *Lactobacillus plantarum*. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 621-633.