

Control biológico mediante rizobacterias de la podredumbre blanca radicular del aguacate (*Rosellinia necatrix*)

Carmen Vida, Antonio de Vicente y Francisco M. Cazorla (Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga).

La podredumbre blanca radicular del aguacate, causada por el hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix*, está considerada como una de las enfermedades limitantes de la producción de este cultivo subtropical en nuestro país. En el presente trabajo, se pone de manifiesto el desarrollo y situación actual de una estrategia para el control de *Rosellinia necatrix*, basada en el empleo de bacterias con actividad de control biológico.

INTRODUCCIÓN

España es el principal país europeo productor de aguacate, con una producción de 69.400 toneladas en el año 2013 (<http://www.fao.org/faostat/en/#data>). Este área de cultivo, de aproximadamente 10.000 hectáreas, se encuentra principalmente en la costa andaluza -Málaga y Granada (España)- donde se alcanzó una producción de 47.500 toneladas en la campaña 2014-2015 (<http://www.asajamalaga.com>). En esta zona en particular, la podredumbre blanca radicular del aguacate causada por el hongo de suelo fitopatógeno *Rosellinia necatrix*, está considerada como una enfermedad emergente para el cultivo, debido en gran medida a unas condiciones ambientales favorables para el desarrollo de este patógeno y al cultivo previo en esta región de otras plantas leñosas susceptibles a este hongo fitopatógeno, como el olivo, el almendro o la vid (Pliego y col., 2012).

La podredumbre blanca radicular del aguacate presenta una serie de síntomas aéreos típicos que suelen aparecer secuencialmente. Comienzan con el amarilleamiento de la copa del árbol, prosiguen con la marchitez y el secado de las hojas, acompañados de una pérdida de vigor del árbol y que en los peores casos, culmina con la muerte de la planta (Figura 1).

El control de la podredumbre blanca radicular del aguacate es complejo y difícil. Hasta el momento, y como ninguna estrategia consigue un efecto significativo por sí misma, se sigue intentado abordar el control de esta enfermedad mediante estrategias integradas. El control químico del patógeno se encuentra actualmente aún en fase experimental, y aunque ya se han estudiado fungicidas del grupo de las dicarboximidias, el fungicida de contacto fluazinam, está resultando ser bastante efectivo sobre plantas jóvenes de aguacate (López-Herrera y Zea Bonilla, 2007). Por otro lado, los métodos físicos tales como la solarización, han arrojado resultados positivos en plantaciones establecidas bajo ciertas condiciones (López-Herrera y col., 1998). En cuanto al control genético, existe en marcha un programa de selección de portainjertos de aguacate tolerantes a *R. necatrix* (Barceló-Muñoz y col., 2007). Adicionalmente, y complementarias a todas estas estrategias, se están desarrollando técnicas de control biológico basadas en agentes microbianos de distinta naturaleza. En este sentido, el hongo *Trichoderma* es uno de los más estudiados hasta la fecha por su efecto negativo sobre el patógeno, mediada tanto por su producción de metabolitos secundarios como por su competición por el nicho y los nutrientes (Arjona-Girona y col., 2014). Por otro lado, existen trabajos científicos que especulan con el posible uso de virus de hongos (micovirus dsRNA) que podrían tener actividad de control biológico al transformar las cepas silvestres virulentas en cepas hipovirulentas, y provocar el efecto conocido como virocontrol (Kanematsu y col., 2010).

Y por último, la estrategia de emplear bacterias como agentes de control biológico frente a distintas enfermedades de plantas, está sufriendo avances significativos en los últimos años que la podrían convertir en una herramienta adicional de control muy útil en pocos años.

Bacterias como agentes de control biológico de *Rosellinia necatrix*

La investigación científica dirigida al estudio del control de enfermedades en plantas empleando

cepas de bacterias como agentes de control biológico ha avanzado mucho en las últimas décadas. En relación con el control de la podredumbre blanca radicular, los primeros trabajos sobre el uso de cepas bacterianas describen el aislamiento de cepas

antagonistas contra *R. necatrix*, pertenecientes al género *Agrobacterium* sp. (Yasuda y Katoh, 1989). Posteriormente, también se han aislado cepas de *Bacillus* sp. y *Pantoea agglomerans*. Sin embargo, los estudios más recientes y completos han

centrado el interés en distintas cepas del género *Pseudomonas*, un grupo de bacterias ampliamente distribuidas por todos los ecosistemas y con multitud de actividades beneficiosas para las plantas (Pliego y col., 2011).

Por ello, nuestro trabajo se ha centrado en la búsqueda de cepas bacterianas que pudieran hacer frente a *R. necatrix* mediante distintos modos de acción, como son el antagonismo, la colonización eficiente de la rizosfera que protegería frente al ataque del patógeno, o la protección directa de la planta de aguacate. Así, los principales microorganismos aislados y estudiados hasta el momento por nuestro grupo de investigación se resumen en la Tabla 1. Para la obtención de estas cepas bacterianas, se realizaron aislamientos desde muestras de raíces sanas procedentes de árboles de aguacate asintomáticos localizados dentro de áreas afectadas por *R. necatrix*. Así, se obtuvo una colección de bacterias aisladas de la raíz sana de aguacate y se seleccionaron aquellas que presentaron alta actividad antagonista frente al patógeno (Figura 2). El estudio detallado de estas bacterias mostró que la mayoría pertenecen al género *Pseudomonas* spp. mencionado anteriormente. Mediante esta estrategia, se obtuvo la cepa *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 (Cazorla y col., 2006), que es la que está siendo empleada como modelo de estudio con mayor profusión y de la que se darán algunos detalles más adelante. De forma simultánea se desarrolló otra búsqueda de cepas basadas en la propiedad de colonizar eficientemente la rizosfera de aguacate. Como resultado se aisló otra cepa de *Pseudomonas* (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* AV0110; Pliego y col., 2007), con actividad de control biológico frente a *R. necatrix*, en este caso mediante la capacidad de colonizar la raíz del aguacate y competir directamente por este nicho con el patógeno (Figura 3). Adicionalmente, también se exploró un método de aislamiento de bacterias basado en la determinación de la capacidad bacteriana para proteger la raíz de aguacate frente a *R. necatrix*, y que nuevamente mostró resultados relacionados con la actividad de bacterias del género *Pseudomonas* (González-Sánchez y col., 2010).

No obstante, no solo se han identificado cepas de *Pseudomonas* spp. como bacterias antagonistas a *R. necatrix*. También se han descrito algunas cepas de *Bacillus subtilis* como posibles agentes de control biológico frente a este hongo patógeno y que han demostrado su capacidad protectora contra este hongo fitopatógeno en ensayos con plantas (Cazorla y col., 2007; González-Sánchez y col., 2010). Y recientemente, en un estudio so-



Figura 1. Sintomatología aérea de la podredumbre blanca radicular del aguacate causada por el hongo *Rosellinia necatrix* sobre árboles de 25 años. A) Aspecto en campo de un árbol asintomático. B) Aspecto en campo de un aguacate con síntomas de podredumbre blanca radicular.

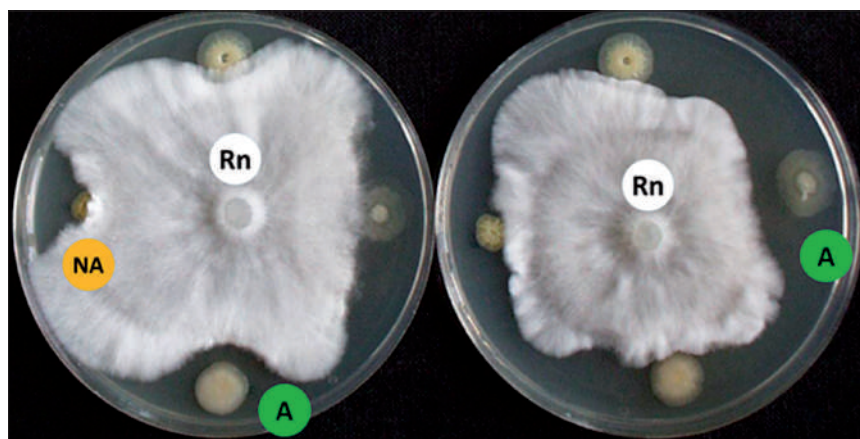


Figura 2. Ensayo de antagonismo en placas de cultivo. Cuatro cepas bacterianas aisladas desde tejidos de aguacate se enfrentan al hongo *R. necatrix* (Rn, en blanco) situado en el centro de la placa. Se observan distintas intensidades de inhibición del micelio fúngico, desde bacterias fuertemente antagonistas (A, en verde), hasta aquellas bacterias que no muestran inhibición aparente del hongo, y consideradas como no antagonistas (NA, en naranja).

Tabla 1. Agentes bacterianos de control biológico aislados y usados como potenciales agentes de control biológico frente *Rosellinia necatrix* en el cultivo del aguacate.

Agentes de control biológico	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i> CB115	González-Sánchez y col., 2010
<i>Bacillus subtilis</i> PCL1608	Cazorla y col., 2007
<i>Bacillus subtilis</i> PCL1612	Cazorla y col., 2007
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> PCL1601	Cazorla y col., 2006
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> PCL1606	Cazorla y col., 2006
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> AV0110	Pliego y col., 2007
<i>Serratia</i> sp.	Vida y col., 2017
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Vida y col., 2017

LAISOL | RAISAN-50

LA MEJOR BASE PARA UNA BUENA COSECHA

ESPECIALISTAS EN
DESINFECCIÓN DE SUELOS



- Polivalencia y eficacia.
- Mecanismo de defensa natural.
- Regeneran la fertilidad del suelo.

"Use los productos fitosanitarios de manera segura. Lea siempre la etiqueta y la información sobre el producto antes de usarlo."



Pol. Ind. Can Jardí
Avda. Bizet, 8-12
08191 RUBÍ (Barcelona)
Tel. 93 586 20 15 | Fax 93 586 20 16
lainco@lainco.es
www.lainco.es



bre la diversidad microbiana presente en suelos supresivos de los cultivos de aguacate también se han identificado algunas cepas bacterianas del género *Serratia* y *Stenotrophomonas* (Vida y col., 2017) como posibles agentes de control biológico frente a *R. necatrix*.

Actualmente se está iniciando los trabajos para obtener una mezcla de varias cepas bacterianas para de esta manera poder aumentar su estabilidad en la raíz del aguacate y que muestran actividad de control biológico combinando distintos mecanismos y adaptándose a diferentes situaciones ambientales, y también para así poder estudiar las interacciones que tienen lugar en este nicho durante el proceso de control biológico.

Pseudomonas chlororaphis PCL1606 como modelo de agente de control biológico contra *Rosellinia necatrix*

En el caso concreto del control de la podredumbre blanca radicular del aguacate, se aisló la cepa antagonista *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 (Cazorla y col., 2006), que ha sido empleada como cepa modelo para diversos estudios. Esta cepa aislada desde raíces sanas de aguacates de suelos infestados por *R. necatrix*, muestra una actividad antagonista muy elevada frente a *R. necatrix* y otros hongos patógenos de suelo. Además, es capaz de colonizar eficientemente las raíces de varias plantas, entre ellas el aguacate. Estudios detallados empleando esta cepa han identificado las bases genéticas y moleculares responsables de la producción del principal compuesto antifúngico que produce *P. chlororaphis* PCL1606; el 2-hexil, 5-propil resorcinol (o HPR). Este compuesto es clave para el antagonismo y la actividad de control biológico contra *R. necatrix* (Calderón y col., 2013), así como en la colonización de la rizosfera de aguacate (Calderón col., 2014). Además, esta bacteria muestra una movilidad elevada, junto a una respuesta de quimiotaxis muy sensible tanto para los exudados de *R. necatrix* como de las raíces del aguacate, lo que implica que cuando esta bacteria detecta la cercanía tanto de la raíz de la planta como del micelio del hongo se mueve activamente hacia ambos nichos. Sobre la raíz de aguacate se lleva a cabo una colonización activa de la superficie que actúa protegiéndola, y sobre el micelio del hongo, tras tomar contacto con él, la bacteria lo invade y lo destruye.

Así, *P. chlororaphis* PCL1606 muestra una elevada capacidad de control biológico en ensayos

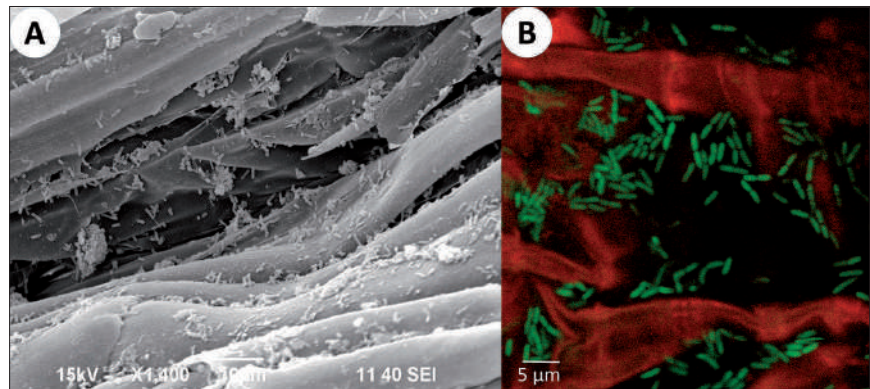


Figura 3. Colonización bacteriana de las raíces de aguacate observada (A) bajo microscopía electrónica de barrido y (B) bajo microscopía láser confocal, donde se observan las bacterias de color verde.

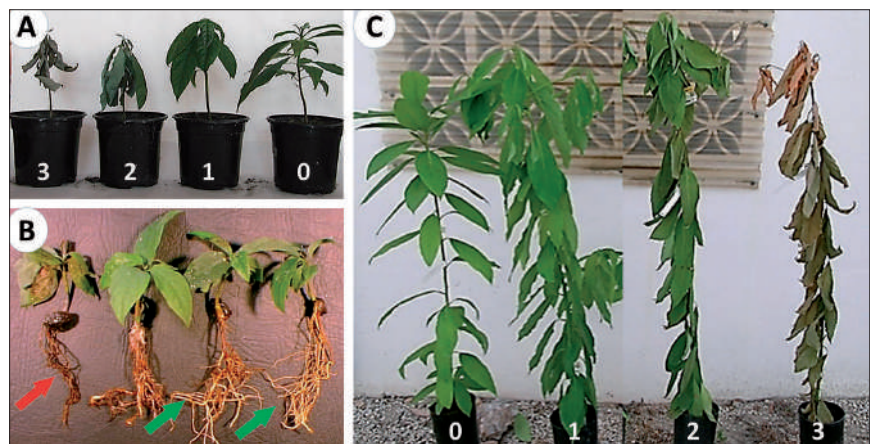


Figura 4. Ensayos de control biológico con plantas de 6 meses (A y B) y dos años (C). (A) Escala aérea de síntomas de podredumbre blanca radicular observados sobre plantas de 6 meses tras 21 días de ensayo. Las raíces de las plantas se inoculan con las distintas bacterias y se planta sobre sustrato infestado con *R. necatrix*. (B) Aspecto de las raíces de aguacate de 6 meses sin inocular (flecha roja) y de raíces inoculadas con *Pseudomonas* sp. con actividad de biocontrol. (C) Ensayo de control biológico con plantas comerciales de 2 años, y escala de síntomas mostrados. 0: sin síntomas; 1: ligera marchitez; 2: comienzo de desecación; 3: muerte. Los ensayos de inoculación con *Pseudomonas* alcanzaron niveles de enfermedad que oscilaron entre 0 y 1, mientras que todas las plantas sin inocular, o inoculadas con cepas sin actividad de control biológico, muestran los niveles 2 y 3.

con plantas jóvenes. En estos ensayos, las raíces de plantas de aguacate de variedades comerciales se inoculan con la cepa PCL1606 y se plantan en macetones con suelo infestado con *R. necatrix*. La presencia de esta bacteria en la raíz del aguacate provoca una disminución significativa en el índice de plantas enfermas al final de los experimentos comparado con los controles sin inocular (Figura 4; González-Sánchez y col., 2013).

Los resultados experimentales obtenidos hasta el momento han animado el inicio de los estudios de formulación de esta bacteria con objeto de desarrollar un producto basado en dicho microorganismo y poner a punto su futura aplicación comercial.

Estos estudios aún están en fase inicial, pero su consecución supondría la apertura de una nueva vía de control de la podredumbre blanca radicular del aguacate, que complementaría las otras ya disponibles.

Abstract: Avocado white root rot caused by the soilborne phytopathogenic fungus *Rosellinia necatrix* is considered as one of the major biological threats influencing the production of this subtropical crop in Spain. In this work, we reported the development and actual situation of a complementary strategy of control, which is the use of rhizobacteria as biological agents against *Rosellinia necatrix*.

Agradecimientos: A la D^a Irene Linares por su inestimable ayuda en los ensayos de biocontrol. Estos trabajos han sido financiados por las ayudas

del Plan Nacional I+D+i del Ministerio de Economía (MINECO), proyectos AGL2011-30354-C02-1 y AGL2014-52518-C2-1-R, cofinanciados con

fondos FEDER (UE). Carmen Vida ha recibido una ayuda del programa FPI (MINECO).

BIBLIOGRAFÍA

- Arjona-Girona, I., Vinale, F., Ruano-Rosa, D., Lorito, M. y López-Herrera, C.J. 2014. Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot et al. 2014. *Eur. J. Plant Pathol. European Journal of Plant Pathology* 140: 385-397.
- Barceló-Muñoz, A., Zea-Bonilla, T., Jurado Valle, I., Imbroda-Solano, I., Vidoy-Mercado, I., Pliego-Alfaro, F. and López Herrera, C.J. 2007. Programa de selección de portainjertos de aguacate tolerantes a la podredumbre blanca causada por *Rosellinia necatrix* en el sur de España (1995–2007). *Viña del Mar: Resúmenes del VI Congreso Mundial de Aguacate*, pp. 1–8.
- Calderón, C. E., Pérez-García, A., de Vicente, A., Cazorla, F. M. 2013. The *dar* genes of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 are crucial for biocontrol activity via production of the antifungal compound 2-hexyl, 5-propyl resorcinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26, 554–565.
- Calderón, C.E., de Vicente, A. y Cazorla, F.M. 2014. Role of 2-hexyl, 5-propyl resorcinol production by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 in the multitrophic interactions in the avocado rhizosphere during the biocontrol process. *FEMS Microbiol. Eco.* 89: 20-31.
- Cazorla, F.M., Duckett, S.B., Bergström, E.T., Noreen, S., Odijk, R., Lugtenberg, B.J.J. et al. 2006. Biocontrol of avocado dematophora root rot by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 correlates with the production of 2-hexyl 5-propyl resorcinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 418–428.
- Cazorla, F.M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B.J.J., de Vicente, A., Bloemberg, G.V. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1950-1959.
- González-Sánchez, M.A., Pérez-Jiménez, R.M., Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A., Cazorla, F.M. 2010. Biocontrol bacteria selected by a direct plant protection strategy against avocado white root rot show antagonism as a prevalent trait. *J. Appl. Microbiol.* 109, 65-78.
- González-Sánchez, M.A., de Vicente, A., Pérez-García, A., Pérez-Jiménez, R., Romero, D. y Cazorla, F.M. 2013. Evaluation of the effectiveness of biocontrol bacteria against avocado white root rot occurring under commercial greenhouse plant production conditions. *Bio. Control* 67: 94-100.
- Kanematsu, S., Sasaki, A., Onoue, M., Oikawa, Y, Ito, T. 2010. Extending the fungal host range of a partitivirus and a mycoreovirus from *Rosellinia necatrix* by inoculation of protoplasts with virus particles. *Phytopathology*, 100, 922-930.
- López-Herrera, C.J., Zea-Bonilla, T. 2007. Effects of benomyl, carbendazim, fluzinam and thiophanate methyl on white root rot of avocado. *Crop Prot.* 26, 1186–1192.
- López-Herrera, C.J., Pérez-Jiménez, R.M., Zea-Bonilla, T., Basallote-Ureba, M.J., Melero-Vara, J.M. 1998. Soil solarization in established avocado trees for control of *Dematophora necatrix*. *Plant Dis.* 82, 1088–1092.
- Pliego, C., Cazorla, F.M., González-Sánchez, M.A, Pérez-Jiménez, R.M., de Vicente, A., Ramos, C. 2007. Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Res. Microbiol.* 158, 463–470.
- Pliego, C., López-herrera, C., Ramos, C., Cazorla, F. M. 2012. Developing tools to unravel the biological secrets of *Rosellinia necatrix*, an emergent threat to woody crops. *Mol. Plant Pathol.* 13, 226–239.
- Vida, C., Cazorla, F.M., de Vicente, A. 2017. Characterization of biocontrol strains after an amendment with composted almond shells from a suppressiveness-induced soil. *Res. Microbiol.* Under review.
- Yasuda, M. and Katoh, K. 1989. Characteristics of bacteria isolated from soil and roots of fruit trees. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35, 501–508.