

Caracterización de nuevos agentes de control biológico bacterianos efectivos frente a *Verticillium dahliae* y otros patógenos de interés en el olivar

David Ruano Rosa, Antonio Valverde Corredor, Carmen Gómez-Lama Cabanás,
Rafael Sesmero Carrasco, Jesús Mercado Blanco

Instituto de Agricultura Sostenible, Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
Avenida Menéndez Pidal s/n; Campus 'Alameda del Obispo'; 14004-Córdoba (España)

RESUMEN

La Verticilosis del olivo, causada por el hongo de suelo *Verticillium dahliae*, se ha convertido en uno de los principales problemas para este cultivo en las últimas décadas. Por ello, la búsqueda de alternativas eficaces para su control constituye uno de los principales objetivos de la comunidad científica, dirigiendo parte de sus esfuerzos al desarrollo de estrategias basadas en el control biológico. Para el presente trabajo se generó una colección de bacterias cultivables colonizadoras naturales de raíces de olivo de más de 300 aislados, para los que se evaluó su antagonismo frente a *V. dahliae*. Tras una primera selección de los más efectivos y de su identificación molecular, se comprobó su actividad antagonista frente a otros patógenos que también afectan al olivar. Se determinó asimismo la presencia de fenotipos habitualmente asociados al antagonismo y/o a la promoción de crecimiento vegetal. Este escrutinio desveló una mayor prevalencia de los *phyla* Proteobacteria y Firmicutes, siendo una cepa de *Paenibacillus polymyxa* la que mostró el mayor rango de acción antagonista (efectiva frente a más del 80% de los patógenos evaluados). Por último, la caracterización fenotípica reveló la existencia de actividades frecuentemente asociadas al control biológico y a la promoción del crecimiento vegetal, destacando la actividad catalasa y de producción de sideróforos

Palabras clave: Antagonismo, Biocontrol, Control Integrado, *Colletotrichum godetiae*, *Colletotrichum nymphaeae*, *Rosellinia necatrix*, Promoción de Crecimiento, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *Verticillium dahliae*

INTRODUCCIÓN

Décadas de abusos en el empleo de sustancias químicas para el control de enfermedades de los cultivos ha generado en la sociedad una creciente demanda de productos agrícolas libres de compuestos perjudiciales tanto para la salud humana y animal como para el medioambiente (Whipps 2001). Sin embargo, esta demanda no es fácil de satisfacer cuando el patógeno causante de la enfermedad es difícil de controlar mediante aproximaciones alternativas al uso de biocidas de base química. Para afrontar con garantías de éxito el manejo de este tipo de patógenos se aconseja la implementación de estrategias de control integrado de las enfermedades por ellos causadas; es decir, combinando herramientas de índole física, cultural,

química y biológica. Este marco de actuación proporcionaría un uso más sostenible de productos fitosanitarios de base química cuando no es posible acudir a alternativas que los excluyan de forma significativa.

El hongo de suelo *Verticillium dahliae* es el agente causal de la Verticilosis del olivo, enfermedad que en las últimas décadas se ha convertido en el principal problema biótico para este cultivo en diversas áreas de la Cuenca Mediterránea. Este patógeno es un claro ejemplo de lo que anteriormente se ha mencionado como agente etiológico de muy difícil control. Entre los motivos que explican este hecho se encuentran, entre otros, su inaccesibilidad ya que durante una parte de su ciclo vital se encuentra confinado en los haces vasculares de la planta. A esto se añade la ausencia de fungicidas sistémicos efectivos, la producción de estructuras de resistencia (microesclerocios) del patógeno capaces de sobrevivir en el suelo de forma latente durante prolongados periodos de tiempo, su capacidad para infectar a un amplio rango de plantas, o a la distribución de material de propagación aparentemente sano pero que puede ser portador del hongo. Diversos factores epidemiológicos contribuyen a explicar la actual extensión del problema y han sido previamente expuestos de forma detallada en la literatura (López Escudero y Mercado Blanco 2011). Sin embargo, este patógeno no es la única amenaza a la que se enfrenta el olivar, existiendo otros agentes como *Colletotrichum* spp. (causante de la antracnosis) o *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (agente causal de la tuberculosis del olivo) cuya relevancia varía de forma estacional o geográfica. Asimismo, otros patógenos podrían ser potencialmente peligrosos en escenarios relacionados, por ejemplo, con la tendencia a incrementar el número y extensión de las explotaciones intensivas, si bien su importancia actual es anecdótica, como el caso de *Rosellinia necatrix* (agente causal de podredumbre radicular) (Trapero y Blanco 2008). Dada la importancia del olivar en España, así como las amenazas y las demandas citadas anteriormente, los esfuerzos de parte de la comunidad científica fitopatológica se han dirigido a la búsqueda de alternativas de control que satisfagan tanto al sector agrícola, proporcionando métodos de

control efectivos y/o complementarios, como a los consumidores, disminuyendo el uso de sustancias químicas causantes de los problemas colaterales ya mencionados.

El uso de agentes de control biológico (ACB) ha emergido en los últimos años como una alternativa a las estrategias basadas exclusivamente en la aplicación de productos fitosanitarios de base química. Así, por ejemplo, la identificación de especies de los géneros bacterianos *Pseudomonas* o *Bacillus* como ACB eficaces frente a diversas enfermedades ha sido constatado en numerosos estudios (Mercado-Blanco y Bakker 2007; Santoyo *et al.* 2012), incluido el caso de la Verticilosis del olivo (Mercado-Blanco *et al.* 2004). Por otra parte, un aspecto de interés, aunque poco explorado aún, es la posibilidad que ofrecen los ACB de poder utilizarse solos o en combinación con otras herramientas de control, dentro de la mencionada estrategia de manejo integrado de esta enfermedad (López-Escudero y Mercado-Blanco 2011).

El presente trabajo ha consistido en: a) la generación de una colección de bacterias cultivables colonizadoras naturales de raíces de olivo; b) la evaluación de la capacidad antagonista de dicha colección frente a *V. dahliae* y otros patógenos que infectan el olivo; y c) la caracterización fenotípica de la 'bacterioteca' generada con el fin de identificar actividades tradicionalmente asociadas al antagonismo y/o a la promoción del crecimiento vegetal. El objetivo fundamental es identificar los mejores aislados bacterianos que puedan servir como base de futuras bioformulaciones efectivas para el control de patógenos que afectan al olivar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generación de una colección de bacterias rizosféricas naturalmente asociadas a plantones de olivo en condiciones de vivero

Se realizaron muestreos en diversos viveros comerciales, productores de plantones de olivo, de la provincia de Córdoba (España). Se recogieron plantones de olivo de la variedad Picual de aproximadamente un año de edad y, a partir de macerados de raíz y suelo rizosférico, se efectuaron aislamientos en medio Luria-Bertani (LB) y agar nutritivo (25°C/oscuridad) y se obtuvieron cultivos puros a partir de todas las colonias crecidas, atendiendo fundamentalmente a su diferente morfología.

Identificación molecular de aislados bacterianos con potencial como agentes de control biológico

El ADN bacteriano se extrajo a partir de 1 ml de cultivo crecido en medio LB a 28°C en agitación (200

rpm) y oscuridad durante 16 horas utilizando el 'JETFLEX Genomic DNA Purification Kit' (Genomed, Löhne, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se efectuaron reacciones PCR para la amplificación específica del gen 16S rDNA en un termociclador Techne TC-512 (Bibby Scientific, Reino Unido), con las siguientes condiciones de reacción: 4 min de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 55°C y 1 min a 72°C, con una extensión final a 72°C durante 10 min. Los cebadores utilizados fueron F27 (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y R1492 (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3'). Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el 'FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit' (Favorgen Biotech Corp.; Pingtung, Taiwan), según las instrucciones del fabricante, y secuenciados en un servicio comercial (Sistemas Genómicos S.L., Valencia, España). Las secuencias obtenidas para cada aislado bacteriano fueron ensambladas en un 'contig' utilizando el software 'CLC bio' (Aarhus, Dinamarca) y comparadas con la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el fin de identificar cada una de las cepas bacterianas.

Evaluación de la capacidad antagonista *in vitro* de bacterias de la rizosfera de olivo frente a diversos patógenos

Con el fin de determinar la actividad antagonista de las bacterias aisladas se realizaron enfrentamientos duales *in vitro*. En los casos de enfrentamientos patógeno fúngico-potencial ACB, se efectuó la siembra de ambos microorganismos simultáneamente con una separación de 2,5 cm, incubándose a 25°C/oscuridad hasta que el crecimiento del patógeno en las placas control cubrió la distancia de separación de 2,5 cm. Para los enfrentamientos patógeno bacteriano-potencial ACB se efectuó la siembra del potencial ACB a evaluar sobre césped bacteriano del patógeno (DO₆₀₀: 0,1) y se incubó a 28°C/oscuridad durante 48 horas. En ambos casos el medio de cultivo utilizado fue patata-dextrosa-agar. Se evaluó la presencia de alguna actividad antagonista como halos o zonas de inhibición y/o cualquier otra característica que pudiera resultar de interés. Los patógenos utilizados en este estudio se recogen en la Tabla 1.

Caracterización fenotípica de potenciales agentes de control biológico

Con el fin de determinar la presencia en los aislados bacterianos de fenotipos tradicionalmente asociados con el antagonismo y con la promoción del crecimiento vegetal, se realizaron ensayos para evaluar las siguientes actividades: proteasa (Naik *et al.* 2013), catalasa (Holt *et al.* 1994), fosfatasa (Katznelson y Bose 1959), quitinasa (Murthy y Bleakley 2012; Nagpure y Gupta 2012), producción

de sideróforos en medio CAS (Schwyn y Neilands 1987) y de 2,3-butanodiol (medio MRVP, según instrucciones de Micro Media, Nebotrade Ltd.; Budapest, Hungría). Con el fin de conocer los requerimientos nutricionales de las cepas seleccionadas, así como una mejor diferenciación de las mismas, se determinó la capacidad de metabolización de 71 fuentes distintas de carbono y 23 sensibilidades químicas mediante la utilización de placas GEN III MicroPlate™ (Biolog; Hayward, CA, Estados Unidos) de acuerdo al protocolo proporcionado por el fabricante. Todos los ensayos se repitieron dos veces en las mismas condiciones.

RESULTADOS

Generación de una bacterioteca e identificación molecular de sus componentes

Se aislaron y obtuvieron cultivos puros de un total de 327 cepas bacterianas, las cuales fueron identificadas con un código numérico y criopreservadas a -80°C hasta su posterior utilización en los diferentes análisis. Los resultados de la identificación molecular (secuencia del gen 16S rDNA) de los aislados bacterianos se recogen en la Tabla 2. El *phylum* predominante fue Proteobacteria, representado mayoritariamente por el género *Pseudomonas*, seguido de Firmicutes, donde el género predominante fue *Bacillus*. Un 22% de los aislados no pudo ser identificado, ya que el nivel de identidad del gen 16S rDNA no fue lo suficientemente significativo para resolver inequívocamente el género.

Evaluación de la capacidad antagonista de aislados bacterianos de la rizosfera de olivo frente a diversos patógenos que afectan al olivar

Un primer cribado frente a un aislado representativo del patotipo defoliante (D) de *V. dahliae* (V-9371) sirvió para identificar unos 120 aislados que presentaron actividad antagonista. Un alto porcentaje de estos aislados seleccionados pertenecían a los *phyla* Proteobacteria (49,2%) y Firmicutes (35,8%). Adicionalmente, se incluyeron en dicha selección representantes de las distintas morfologías observadas por cada vivero (69 aislados). El fenotipo antagonista observado fue posteriormente corroborado en un segundo escrutinio frente a otro representante del patotipo D (Lebrija 1), así como frente a uno del patotipo no-defoliante (ND) (V-2491). Los experimentos realizados frente a otros patógenos de olivo (Tabla 1) dieron como resultado que el espectro de inhibición más amplio lo presentaba una cepa identificada como *Paenibacillus polymyxa*, que mostró capacidad antagonista frente a cerca del 90% de los patógenos evaluados, presentando normalmente zonas de inhibición de

gran tamaño. Con altos porcentajes de antagonismo (efectivos frente al 75% de los patógenos) también se identificaron diversas cepas de *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Bacillus*, así como otra de *Paenibacillus* sp.

Caracterización fenotípica de potenciales agentes de control biológico

La Tabla 3 recoge el porcentaje de aislados que mostraron los fenotipos evaluados en este trabajo. La característica fenotípica más abundante entre las cepas estudiadas fue la actividad catalasa, presente en el 100% de las bacterias, siendo la actividad fosfatasa la menos frecuente (2,1%) (Tabla 3). Respecto a la actividad quitinasa destacó una cepa del género *Serratia* sp., que presentó un halo de actividad seis veces superior al diámetro de la colonia. En cuanto a producción de sideróforos, destacó alguna cepa del género *Pseudomonas* sp., con producción de halos en medio CAS de tamaño tres veces superiores al diámetro de su colonia. Respecto a las cepas que presentaron actividad proteasa y producción de 2,3-butanodiol, éstas pertenecían principalmente al *phylum* Firmicutes.

DISCUSIÓN

El proceso de selección de nuevos ACB es una tarea ardua que en ocasiones no da los resultados esperados. Uno de los principales problemas radica en el uso de ACB que, habiendo sido aislados en un determinado nicho ecológico, son empleados en otro donde operan condiciones ambientales y relaciones tróficas totalmente diferentes a las que se encuentran en el ambiente original. Autores como Knudsen *et al.* (1997) consideran esencial que antagonista y patógeno ocupen y estén adaptados al mismo nicho ecológico. Esta premisa fue asumida en el diseño de una estrategia cuyo primer objetivo fue la obtención de una 'bacterioteca' que, originaria de raíz y rizosfera de plantones de olivo, pudiera contener ACB efectivos frente a *V. dahliae*. El análisis molecular de dicha colección de cepas cultivables desveló que la mayoría de ellas pertenecían a los *phyla* Proteobacteria y Firmicutes, coincidiendo con resultados previos de otros autores para el caso de acebuches (Montes Borrero *et al.* 2012).

Los resultados obtenidos tras enfrentar las cepas seleccionadas a una batería de patógenos que afectan al olivar revelaron que un amplio número de ellas mostraba actividad antagonista *in vitro*, no solo frente a *V. dahliae* sino también frente al resto de patógenos estudiados. Destacaron por su amplio espectro de acción cepas pertenecientes a los géneros *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Bacillus*. De entre todas, una cepa de *P. polymyxa*

fue la que presentó mayor rango de antagonismo y de intensidad del efecto inhibitor, muy superior al resto de aislados bacterianos. Esta especie ya ha sido identificada por otros autores como un buen ACB frente a *V. dahliae* en algodón (Yang *et al.* 2013) y otros patógenos de suelo (Haggag y Timmusk, 2008). De igual forma, aunque con menor intensidad, lo hicieron representantes de otros tres géneros. Entre ellos destacaron representantes de *Pseudomonas* spp., género bacteriano ampliamente documentado tanto en cuanto a su actividad antagonista como de promoción de crecimiento (Mercado-Blanco y Bakker 2007). Un claro ejemplo es el ofrecido por *P. fluorescens* PICF7, cepa aislada de raíces de olivo y efectiva en el control del patotipo D de *V. dahliae* (Mercado-Blanco *et al.* 2004), además de ser capaz de establecerse como endófito (Prieto y Mercado-Blanco, 2008) y de inducir respuestas defensivas en tejidos de olivo, tanto locales como sistémicas (Schilirò *et al.* 2012; Gómez-Lama *et al.* 2014).

Los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto la existencia de actividades que se encuentran frecuentemente relacionadas con el control biológico, como la producción de enzimas líticas ligadas al antagonismo (Martínez-Viveros *et al.* 2010), y la existencia de actividades asociadas con la promoción del crecimiento. De entre todas las características fenotípicas estudiadas destacó la producción de sideróforos, muy extendida en los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, y cuya síntesis permite a las bacterias productoras competir favorablemente frente a otros microorganismos por hierro, factor nutricional limitante en numerosos nichos ecológicos como la rizosfera. La producción de sideróforos por cepas de *Pseudomonas* spp. también se ha relacionado con el control de patógenos del suelo (Mercado-Blanco *et al.* 2004; Solanki *et al.* 2014).

En conclusión, disponemos de una colección de bacterias muy diversas procedentes de raíces de plántulas de olivo y de su rizosfera, con clara actividad antagonista frente a diversos patógenos que infectan olivo, principalmente *V. dahliae*. Muchas de ellas también presentan actividades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal. Algunas de estas bacterias podrían constituir la base de futuras bioformulaciones efectivas en el control biológico de los patógenos evaluados.

AGRADECIMIENTOS

Trabajos financiados por los proyectos P12-AGR667 de la Junta de Andalucía y RECUPERA 2020 del Ministerio de Economía y Competitividad/Agencia

Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, ambos cofinanciados con fondos FEDER de la Unión Europea.

BIBLIOGRAFÍA

- Collado-Romero, M., Mercado-Blanco, J., Olivares-García, C., Valverde-Corredor, A., *et al.* (2006). *Phytopathology* 96:485-495.
- Gómez-Lama, C., Schilirò, E., Valverde-Corredor, A., Mercado-Blanco, J. (2014). *Frontiers Microbiol.* 5: art. 427.
- Haggag, W.M., Timmusk, S. (2008). *J. Appl. Microb.* 104:961-969.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., *et al.* (1994). 9th ed. Baltimore (MD): Williams and Wilkins.
- Katznelson, H., Bose, B. (1959). *Can J Microbiol* 5:79-85.
- Knudsen, I.M.B., Hockenhull, J., Funck Jensen, D., Gerhardson, B., *et al.* (1997). *Eur. J. Plant Pathol.* 103:775-784.
- López-Escudero, F.J., Mercado-Blanco, J. (2011). *Plant Soil* 344:1-50.
- López-Herrera, C.J., Zea-Bonilla, T. (2007). *Crop Prot.* 26:1186-1192.
- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G., Mora, M.L. (2010). *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10:293-319.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A., Jiménez-Díaz, R.M. (2004). *Biol. Control* 30:474-486
- Mercado-Blanco, J., Bakker, A.H.M. (2007). *A. Van Leeuw.* 92:367-389.
- Montes Borrego M., Aranda Ocampo, S., Landa, B.B. (2012). *Agr.* 951:342-346.
- Moral, J., Jurado, J., Trapero, A. (2012). *IOBC-WPRS Bulletin* 79:14
- Murthy, N.K.S., Bleakley, B.H. (2012). *Internet J Microbiol* 10
- Nagpure, A., Gupta, R.K. (2012). *J. Basic Microbiol.* 53:429-439.
- Naik, D.N., Wahidullah, S., Meena, R.M. (2013). *Lett. in Appl. Microbiol.* 56:197-207.
- Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Moreno, L., Matas, I.M., Ramos, C. (2007). *Res. Microbiol.* 158:60-69.
- Prieto, P., Mercado-Blanco, J. (2008). *FEMS Microbiol. Ecol.* 64:297-306.
- Santoyo, G., Del Orozco-Mosqueda, M.C., Govindappa, M. (2012). *Biocontrol Sci. Technol.* 22:855-872
- Schilirò, E., Ferrara, M., Nigro, F., Mercado-Blanco, J. (2012). *PLoS ONE* 7 (11): e48646.
- Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987). *Anal. Biochem.* 160:47-56.
- Solanki, M.K., Singh, R.K., Srivastava, S., Kumar, S., *et al.* (2014). *J. Basic Microbiol.* 54:585-596.
- Trapero, A., Blanco, M. (2008). Ediciones Multiprensa y Junta de Andalucía, España. pp. 595-656.
- Whipps, J.M. (2001). *J Exp Bot* 52:487-511.
- Yang, P., Sun, Z.X., Liu, S.Y., Lu, H.X., Zhou, Y., and Sun, M. (2013). *Crop Protec.* 47:17-23.

Tabla 1. Patógenos utilizados en los ensayos de antagonismo *in vitro* frente a una 'bacteriotea' de potenciales agentes de control biológico procedentes de raíces de plantones de olivo.

Aislado/cepa	Especie	Referencia o Fuente
V-937I	<i>Verticillium dahliae</i> (D)	Collado-Romero <i>et al.</i> 2006
Lebrija 1	<i>V. dahliae</i> (D)	Colección de cultivos del Laboratorio de Interacciones Planta-Microorganismo, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba, España;
V-249I	<i>V. dahliae</i> (ND)	Collado-Romero <i>et al.</i> 2006
PSS-3	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Colección de cultivos del Laboratorio de Interacciones Planta-Microorganismo, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba, España
NCP PB 3335	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Pérez-Martínez <i>et al.</i> (2007)
Col. 114	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	Moral <i>et al.</i> 2012
Col. 516	<i>Colletotrichum godetiae</i>	Dr. A. Trapero Casas, Universidad de Córdoba, Córdoba, España
Rn 320	<i>Rosellinia necatrix</i>	López-Herrera y Zea-Bonilla (2007)
Rn 400	<i>R. necatrix</i>	López-Herrera y Zea-Bonilla (2007)

Tabla 2. Identificación mediante amplificación específica del gen 16S rDNA de 189 cepas bacterianas aisladas de raíz y suelo rizosférico de plantones de olivo (var. Picual) procedentes de viveros comerciales de la provincia de Córdoba.

Phylum	Clase	Género	Porcentaje (%)
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Curtobacterium</i>	0,5
		<i>Microbacterium</i>	1,1
		<i>Streptomyces</i>	2,1
Firmicutes	Bacilli	<i>Bacillus</i>	26,5
		<i>Paenibacillus</i>	1,1
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Agrobacterium</i>	0,5
		<i>Ensifer</i>	1,1
		<i>Rhizobium</i>	4,2
		<i>Roseomonas</i>	0,5
		<i>Sinorhizobium</i>	1,1
	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter</i>	1,6
		<i>Cupriavidus</i>	1,6
		<i>Massilia</i>	1,1
	Gammaproteobacteria	<i>Cronobacter</i>	3,7
		<i>Enterobacterium</i>	0,5
		<i>Erwinia</i>	0,5
		<i>Pseudomonas</i>	27,0
		<i>Pseudothaxonomonas</i>	1,1
		<i>Serratia</i>	1,1
	<i>Xanthomonas</i>	1,1	
Sin clasificar*			22,2

* La comparación en las bases de datos de la secuencia del gen 16S rDNA no fue suficiente para resolver inequívocamente el género bacteriano.

Tabla 3. Porcentaje de aislados bacterianos que presentan alguna actividad relacionada con control biológico y/o promoción del crecimiento

Característica fenotípica	Porcentaje de aislados (%)*
Producción de 2,3-butanodiol	30,2
Actividad proteasa	29,1
Actividad fosfatasa	2,1
Producción de sideróforos	49,2
Actividad catalasa	100
Actividad quitinasa	20

*Sobre un total de 189 aislados evaluados.