

## Hacia una agricultura sostenible: biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

Aránzazu Gómez-Garay; Luisa Martín Calvarro; Elena Pérez-Urriá Carril; Beatriz Pintos López (Dept. de Biología Vegetal I: Botánica y Fisiología Vegetal. Facultad de Biología-Univ. Complutense de Madrid).

La búsqueda de alternativas al uso de fungicidas sintéticos se ha convertido en los últimos años en un objetivo clave para alcanzar los ideales de una "agricultura sostenible". La formación de los nuevos profesionales en este sector debe ser por lo tanto un objetivo educativo que se plasma en el desarrollo de las prácticas realizadas en el Máster Universitario en Biología Vegetal Aplicada-UCM. Diversas alternativas: antagonistas (fúngico como *Trichoderma harzianum* y bacteriano como *Pseudomonas fluorescens*), extractos vegetales (aceite de tomillo) y otras sustancias (cloruro cálcico), se han analizado en el control de cepas de diferente virulencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, un importante patógeno del tomate, cultivo estratégico para las economías mundial y española.

Es en este momento, cuando para hablar de una "agricultura sostenible" no podemos ignorar los tres pilares indispensables que la sustentan: el respeto por el medio ambiente, la seguridad alimentaria y la propia sostenibilidad de la empresa agrícola.

Es en este escenario, donde la importancia del control de las enfermedades vegetales precisa de nuevas estrategias y enfoques que deben aunar los tres objetivos señalados con procesos y técnicas que garanticen esta sostenibilidad. Las enfermedades que afectan a la producción de los cultivos más importantes en nuestro país deben convertirse por lo tanto en un objetivo prioritario del sistema de investigación-desarrollo-innovación que debe comenzar con la formación de los futuros profesionales del sector.

Es en este contexto, en el que se enmarcan las prácticas realizadas en la Primera Edición del Máster en Biología Vegetal Aplicada de la Universidad Complutense de Madrid ya que esta titulación nace con el objetivo de formar especialistas y profesionales cualificados en el ámbito científico de la Biología Vegetal en cuanto a procesos, técnicas, usos y aplicaciones de plantas, algas y hongos, por medio de una enseñanza teórica, práctica y aplicada que les permita la incorporación a la actividad investigadora o bien adquirir competencias que les permitan desarrollar proyectos investigadores o de empresa en un contexto de emprendedores o

incorporarse a empresas.

Es en estas prácticas donde el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se convierte en el foco central ya que este cultivo es la hortaliza más difundida y la de mayor valor económico en todo el mundo. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio (MAGRAMA, 2008). En España la superficie dedicada al tomate supera las 48.000 hectáreas (más de 17.000 de ellas en cultivo protegido) y la producción está próxima a los cuatro millones de toneladas (datos de estadística MAGRAMA 2011). El cultivo se ve afectado entre otros por la fusariosis del cuello y de las raíces del tomate causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl). Se trata de una micosis cada vez más extendida en los cultivos del tomate en Almería (donde se concentra el 23% de la producción nacional) siendo tan grave como para afectar al 78% de las plantas en cultivo protegido (García Rodríguez y col., 2012).

Es en la lucha contra la enfermedad donde el empleo de fungicidas sintéticos convencionales no resulta una alternativa adecuada, porque no se ajustan a los criterios de la "agricultura sostenible" pero también porque resultan poco eficaces en el caso de enfermedades vasculares como las producidas por *Fusarium*. La solución al problema pasa entonces por la utilización de variedades resistentes a las diferentes razas del patógeno que se encuentran disponibles comercialmente pero que

sin embargo pueden mostrar algunos síntomas o daños ante ataques severos.

Es en esta situación cuando el control biológico (mediante el uso de microorganismos antagonistas y sustancias vegetales) y otras alternativas (como el uso de cloruro cálcico) se convierte en estrategias que hay que considerar ante el manejo de la enfermedad.

El control mediante microorganismos antagonistas se produce de forma natural en los suelos. Entre estos microorganismos se encuentran los mejores agentes de biocontrol que son aquellos asociados a las plantas formando parte de la rizosfera como el hongo *Trichoderma* sp. y la bacteria *Pseudomonas* sp. (Srivastava y col., 2010).

Los microorganismos antagonistas presentan aspectos beneficiosos para la planta más allá del control de hongos fitopatógenos como Forl. Estos efectos beneficiosos derivan de otras capacidades de los organismos que difieren dependiendo de su propia naturaleza. En el caso de *Trichoderma* la reducción en la severidad de las enfermedades se basa en la inhibición de los patógenos en suelo ya que se trata de un potente antagonista que además es un micoparásito. A esto hay que añadir que *Trichoderma* interactúa directamente con las raíces incrementando el potencial de crecimiento de las plantas, la resistencia a las enfermedades y la tolerancia al estrés abiótico (Hermosa y col., 2012). En el caso de *Pseudomonas*, éstas perte-

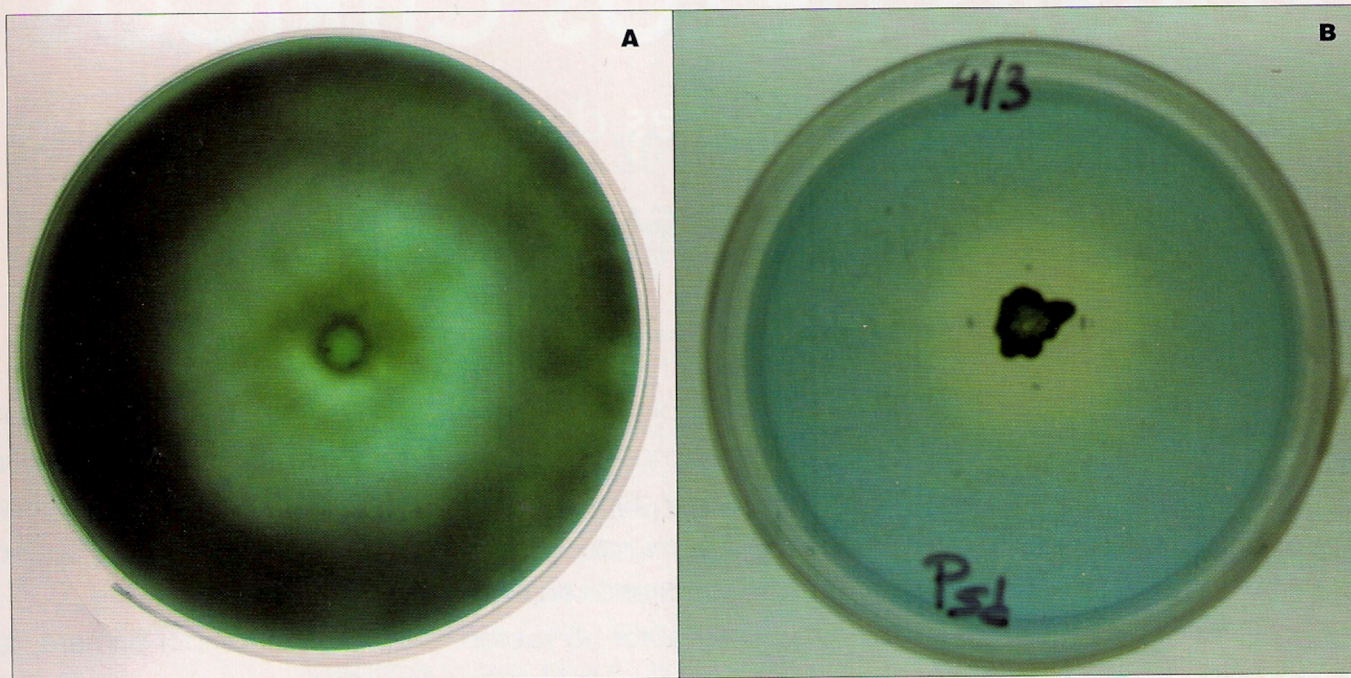


Figura 1. Cultivo en medio sólido con fosfato de calcio y verde de bromocresol de 1.a *Trichoderma harzianum* y 1.b. *Pseudomonas fluorescens*. El halo incoloro formado muestra la capacidad solubilizadora de fosfatos de ambos microorganismos.

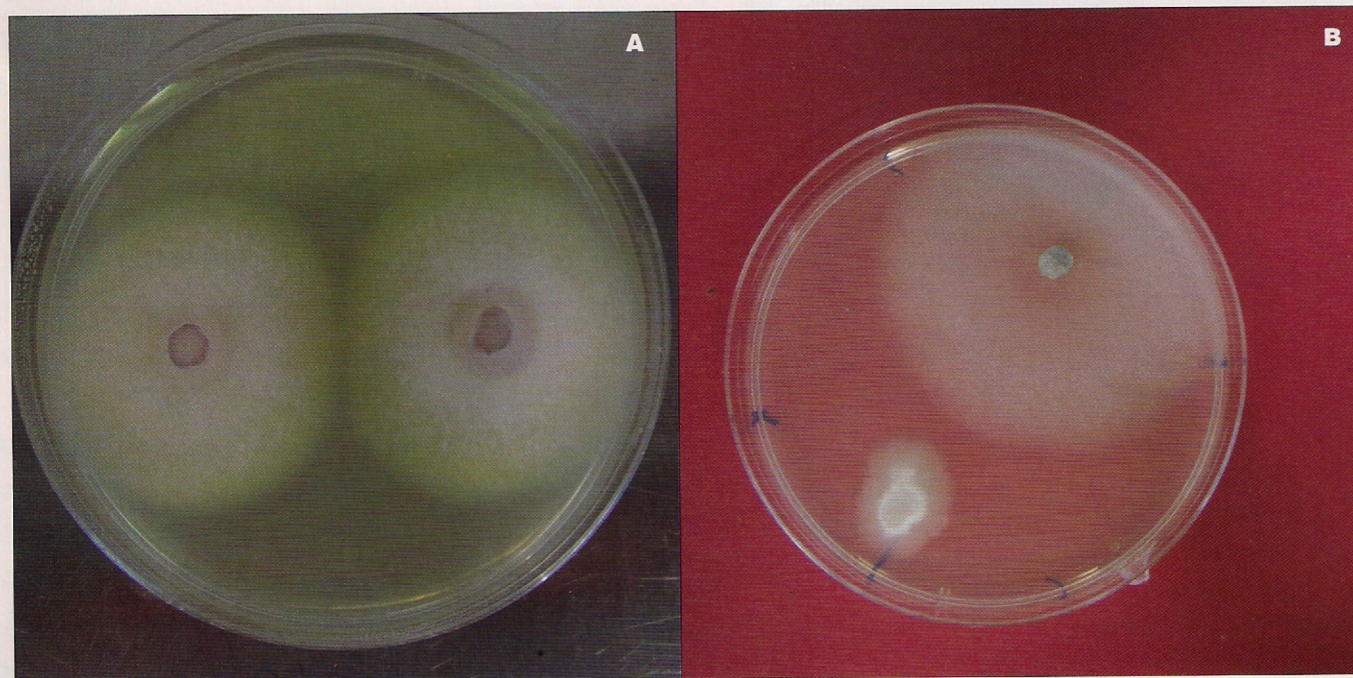


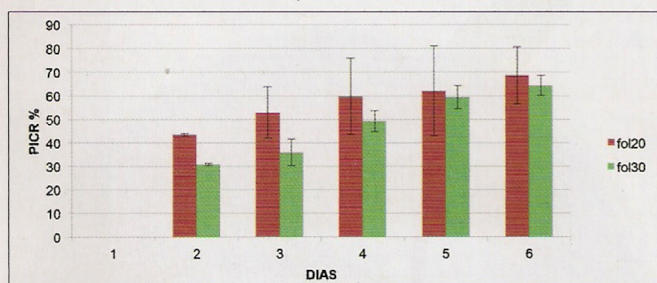
Figura 2. Ensayos duales de enfrentamiento de las diferentes cepas de 2.a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) y 2.b *Trichoderma harzianum* frente al hongo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Se aprecia la inhibición del crecimiento de Forl por *T. harzianum*.

necen al grupo de bacterias denominadas PGPR (Plant Growth Promoting-Bacteria; bacterias promotoras del crecimiento vegetal). El sistema de promover el crecimiento vegetal que utilizan las PGPR puede ser de dos tipos: indirecto o directo. En el indirecto se encuentran la prevención o el

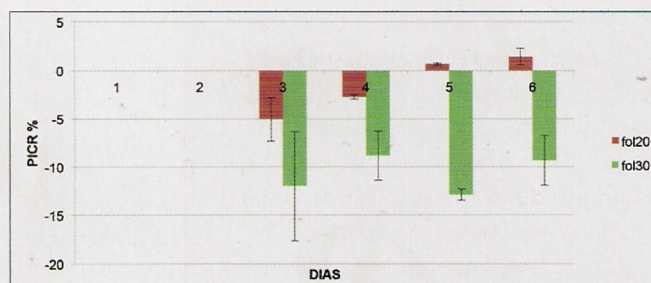
efecto deletéreo sobre diversos fitopatógenos. En el directo encontramos que facilitan la absorción de nutrientes desde el medio y que proporcionan a la planta fitohormonas implicadas en el crecimiento vegetal como las auxinas que es el modo de acción de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* utilizada

en este estudio.

Entre los aspectos beneficiosos que se atribuyen a estos organismos se encuentra también la capacidad de solubilizar los fosfatos presentes en el medio de forma que éstos pasan a formas absorbibles por las plantas (Alam y col., 2002;



**Figura 3.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los aislados Forl20 y Forl30 en los ensayos duales de enfrentamiento con *Trichoderma harzianum*.



**Figura 4.** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los aislados Forl20 y Forl30 en los ensayos duales de enfrentamiento con *Pseudomonas fluorescens*.

Yadav y col., 2013). El fósforo es tras el nitrógeno el segundo nutriente mineral más importante. La disponibilidad de fósforo en el suelo es baja ya que éste se presenta en formas insolubles fijado como fosfatos de hierro  $FePO_4$ , aluminio  $AlPO_4$  y calcio  $Ca_3(PO_4)_2$  y las plantas lo absorben principalmente como ortofosfatos solubles ( $H_2PO_4^-$  y  $HPO_4^{2-}$ ). Para determinar la capacidad de solubilización del fósforo se ha realizado un sencillo test colorimétrico que permite determinar la solubilización de los fosfatos en el medio de cultivo. El fundamento básico de este test consiste en proporcionar un medio de cultivo al organismo en el que la única fuente de fósforo es fosfato insoluble ( $Ca_3(PO_4)_2$ ) y un indicador de pH (verde de bromocresol) que permite valorar la solubilización de fosfato basándose en que ésta va acompañada de una liberación de protones que acidifica el medio.

Los resultados del test de fosfatos han revelado la capacidad de ambos, *T. harzianum* (Figura 1-a) y *P. fluorescens* (Figura 1-b), de solubilizar fosfatos. En el caso de *T. harzianum* se produce un incremento en la solubilización de fosfatos a medida que se produce el crecimiento del micelio. En el caso de *P. fluorescens* el halo de degradación permanece constante a lo largo del tiempo.

En cuanto al antagonismo con los dos microorganismos beneficiosos para la planta, *T. harzianum* y *P. fluorescens*, se procedió al co-cultivo en medio base (Figura 2a) para medir el crecimiento micelial del patógeno en presencia de sí mismo (lo que permite valorar el efecto de competencia) y también se cultivó en presencia del antagonista (Figura 2b), con el objetivo de valorar el efecto antagonista más allá de la simple competencia por el espacio y los nutrientes. El cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) mostró un importante efecto de *T. harzianum* sobre el crecimiento micelial de Forl para los dos aislados ensayados (el más y el menos agresivo) que se pudo

apreciar como un menor crecimiento radial desde el día siguiente a la siembra de ambos hongos en la placa (Figura 3), inhibición que se incrementa con el paso del tiempo y que, aunque en un principio (el primer día) parece mostrar diferencias significativas entre Forl 20 y Forl 30, al pasar los días se aprecia que las diferencias desaparecen. El grado de parasitismo se determinó mediante la escala de Ezziyyani y col. (2004), determinándose un grado 3-4 de capacidad antagonica con invasión total de la superficie de la colonia de Forl y esporulación sobre ella.

El cálculo del PICR en el antagonismo con *P. fluorescens* difiere del de *T. harzianum*. No se aprecia un efecto sobre el crecimiento micelial de Forl 30 a lo largo de la duración del experimento, es más, incluso se observan valores negativos (Figura 4) que se atribuyen a la falta de competencia por el espacio y el medio. Es diferente en el caso de Forl 20 donde se puede apreciar el efecto antagonista a partir del quinto día de cultivo, aunque este efecto es muy leve y claramente mucho menor que el observado cuando el antagonista es *T. harzianum*.

Con el objetivo de comprobar la efectividad de ambos microorganismos en el control de Forl se procedió a realizar un ensayo de *biopriming* (mediante esta técnica se recubren las semillas de una película que incluye el compuesto activo), en este caso, en el recubrimiento se incluyeron cada uno de los dos microorganismos testados. Para valorar el efecto se procedió a la germinación de las semillas en presencia y en ausencia del patógeno y se valoraron diferentes parámetros (peso fresco, longitud de la raíz y la longitud del tallo) cuyos resultados se muestran en la Figura 5.

Forl20 produjo un claro efecto negativo con una significativa reducción en los tres parámetros analizados (Figura 5 a,b,c), efecto que sólo se observó cuando el patógeno era Forl30 y el parámetro medido la longitud de la parte aérea (Figura 5c).

Esta reducción en los parámetros de crecimiento de las plántulas a consecuencia del ataque de Forl se ve mitigada cuando las semillas estaban tratadas con ambos microorganismos y es especialmente significativa cuando el patógeno es más agresivo (Forl20). Incluso cuando el patógeno era Forl30 se pudo observar un mayor valor en el peso fresco de las plántulas obtenidas de semillas tratadas con *P. fluorescens* que en las procedentes de las semillas no tratadas.

Otros métodos de control biológico derivan del uso de sustancias de origen natural como los aceites vegetales. Entre estos, los aceites de tomillo presentan un importante efecto antimicrobiano comparados con los de otras plantas (Rasooli y col., 2004). Su efectividad ha quedado demostrada en el control de Forl observándose el efecto fungicida sobre ambos aislados (Forl20 y Forl30), presentando una única placa crecimiento para Forl30 siendo el efecto fungistático, es decir se apreció crecimiento después de cinco días en cultivo pero éste se detuvo y no se pudo apreciar un incremento en los días posteriores. Sin embargo, en el análisis mediante *biopriming* sólo se observó un ligero efecto beneficioso sobre la longitud del tallo cuando el patógeno presente era el más agresivo (Figura 5).

Otra de las alternativas al empleo de fungicidas sintéticos es el cloruro de calcio. El cloruro cálcico ( $Cl_2Ca$ ) se ha utilizado eficazmente al tratar plantas de tomate previamente a la inoculación con Forl (Biswas y col., 2012) y es un sistema de eficacia ampliamente demostrada en tratamientos pre y postcosecha en diversos cultivos y enfermedades.

El potencial efecto del cloruro cálcico se ha estimado mediante la medida de la tasa de crecimiento  $\mu$  (siendo  $\mu$  la variación de la extensión de la colonia fúngica durante un periodo de tiempo; Chervin y col., 2009) y los resultados muestran que el cloruro cálcico ejerce un efecto negativo

sobre el crecimiento micelial de ForI, para ambos aislados, ForI20 y ForI30 siendo este efecto especialmente importante en el caso de ForI20. En el ensayo de bioprimering se ha visto un efecto beneficioso en el desarrollo de la parte aérea de las plántulas (longitud del tallo) que se refleja también en el peso que es más significativo cuando el ataque estaba producido por el patógeno más agresivo (Figura 5).

En conclusión, los estudios *in vitro* (desarrollados durante las prácticas de Fisiopatología del Máster Universitario en Biología Vegetal Aplicada), tanto de crecimiento en placa como de bioprimering de semillas, demuestran la potencialidad del uso de diversas alternativas a los fungicidas sintéticos en el control de *ForI* mediante: 1) antagonistas como *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas fluorescens*; 2) aceite de tomillo y 3) cloruro cálcico. Se ha determinado la existencia de diferencias en la respuesta condicionada por la agresividad del patógeno, observándose un efecto beneficioso en el caso del patógeno menos virulento que mejora el *fitness* de la planta respecto incluso a los controles en ausencia

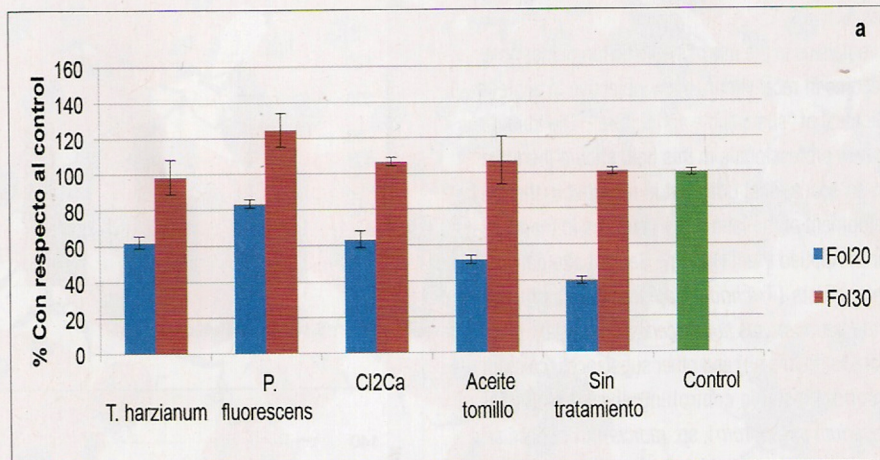


Figura 5. Germinación de las semillas de tomate en presencia y en ausencia del patógeno (ForI) y efecto de diferentes tratamientos (*T. harzianum*, *P. fluorescens*, Cl<sub>2</sub>Ca y aceite de tomillo) sobre los parámetros: a. peso fresco de la plántula.

de patógeno como consecuencia de la capacidad de los antagonistas de producir fitohormonas o favorecer la solubilización de fosfatos. En el caso del patógeno más virulento el efecto de los tratamientos

supone una mejora significativa en el crecimiento de plantas enfermas, pero no se trata de un efecto total que iguale éste al de las plantas sanas.

## Combate a los insectos y ácaros de la manera más natural

Las piretrinas naturales son insecticidas y acaricidas con una rápida acción de contacto, un amplio espectro y sin residuos.

KENPHYR es un producto totalmente natural, obtenido de flores secas de Pelitre (*Crysanthemum cinerariifolium*), con una riqueza de un 4% DE PIRETRINAS y formulado con una base de aceites vegetales, principalmente aceite de soja, que incrementan su actividad insecticida.

Se recomienda su utilización para el control de mosca blanca trips, pulgones, cochinillas, orugas, escarabajos, hormigas y ácaros en hortícolas y ornamentales.

## EXTRACTO DE PELITRE

# KENPHYR

## PIRETRINAS NATURALES



Apto para cultivo ecológico



INSCRITO EN EL REGISTRO OFICIAL DE PRODUCTOS Y MATERIAL FITOSANITARIO CON EL N° 25.297/19

## ABSTRACT

Alternatives to the use of synthetic fungicides have become in recent years a key objective to achieve the ideal of "sustainable agriculture". The training of new professionals in this field should therefore be an educational goal that is reflected in the development of the laboratory practices in the Master in Applied Plant Biology. Several alternatives: antagonists (*Trichoderma harzianum* as fungal and *Pseudomonas fluorescens* as bacterial), plant extracts (thyme oil) and other substances (calcium chloride), used in controlling diverse strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, an important pathogen of tomato, a strategic crop for both the global and the Spanish economy.

**Agradecimientos:** Agradecemos a Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud de la Facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo CEU por proporcionarnos la cepa de *Pseudomonas fluorescens*, a Koppert Biological Systems por proporcionarnos Trianium-G (para los ensayos con *Trichoderma harzianum*), a Monsanto-España por las semillas de tomate sensible a For1 y a David Valera y Raquel Alonso por su inestimable ayuda técnica.

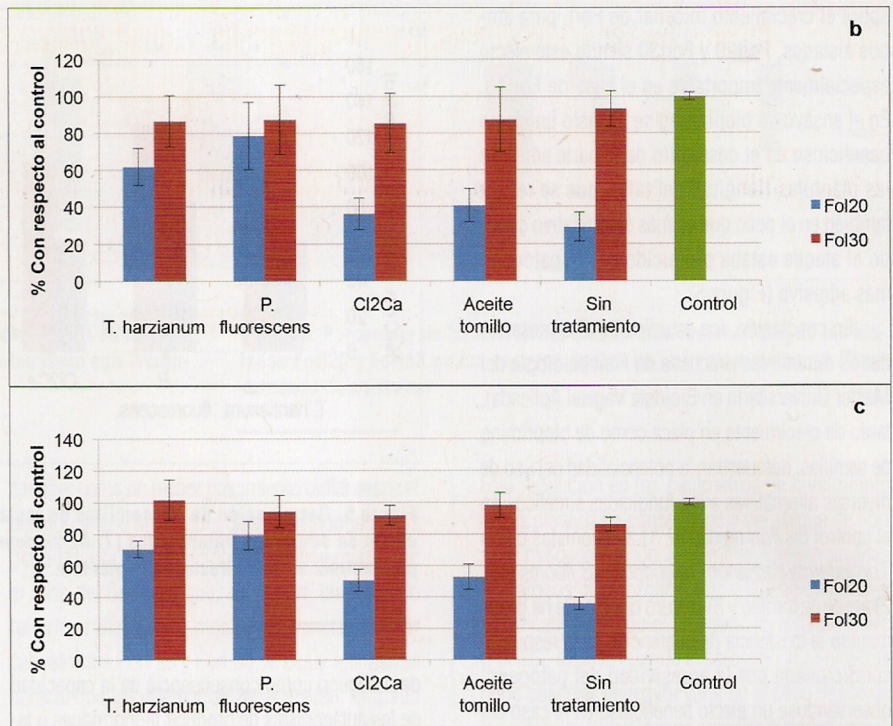


Figura 5. Germinación de las semillas de tomate en presencia y en ausencia del patógeno (For1) y efecto de diferentes tratamientos (*T. harzianum*, *P. fluorescens*, Cl<sub>2</sub>Ca y aceite de tomillo) sobre los parámetros: b. longitud de la raíz y c. longitud del tallo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alam S, Khalil S, Ayub, N, Rashid M. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. International Journal of Agriculture and Biology 2002, 4(4): 454-458.
- Biswas SK, Pandey NK, Mohd Rajik. Inductions of defense response in tomato against *Fusarium* wilt through inorganic chemicals as inducers. Plant Pathology & Microbiology 2012, 3(4): 1000128.
- Chervin C, Lavigne D, Westercamp P. Reduction of gray mold development in table grapes by preharvest sprays with ethanol and calcium chloride. Postharvest Biology and Technology 2009, 54: 115-117.
- Ezziyiani M, Pérez SC, Requena ME, Rubio L, Candela ME. Biocontrol of *Streptomyces rochei-ziyani*, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 2004, 26: 69-78.
- García Rodríguez C, Ruiz Olmos CA, Palmero Llamas D, De Cara García M, Díaz Pérez M, Camacho Ferré F, Tello Marquina JC. Comportamiento de patrones de tomate frente a la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Actas de Horticultura 2012, 60: 318-320.
- Hermosa R, Viterbo A, Chef I, Monte E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology 2012, 158: 17-25.
- MAGRAMA. 2008. <http://www.magrama.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=2193>
- MAGRAMA 2012. Anuario de Estadística 2011.
- Rasooli I, Abyaneh MR. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control 2004, 15: 479-483.
- Srivastava R, Khalid A, Singh US, Sharma AK. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *trichoderma harzianum* formulation against *fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. Biological Control 53: 24-31, 2010
- Yadav SK, Dave A, Sarkar A, Singh HB, Sarma BK. Co-inoculated biopriming with *Trichoderma*, *Pseudomonas* and *Rhizobium* improves crop growth in *Cicer arietinum* and *Phaseolus vulgaris*. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology 6(2): 255-259, 2013