

El agente de control biológico *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606: una alternativa sostenible en la lucha contra *Rosellinia necatrix*

José A. Gutiérrez-Barranquero, Eva Arrebola, Sandra Tienda, Rafael Villar-Moreno, Zaira Heredia-Ponce, Antonio de Vicente, Francisco M. Cazorla

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, España

E-mail: jagutierrez@uma.es / cazorla@uma.es

En este artículo se resumen los estudios realizados por nuestro grupo de investigación durante más de 10 años sobre la cepa bacteriana *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606, que muestra actividad de control biológico, y que puede convertirse en una estrategia sostenible con el medio ambiente y complementaria al control físico y químico, para luchar contra *Rosellinia necatrix*, el hongo fitopatógeno causante de la podredumbre blanca radicular del aguacate.



Rosellinia necatrix es un hongo fitopatógeno de suelo, distribuido a nivel mundial en regiones con clima mediterráneo, y que afecta gravemente a diferentes cultivos leñosos como son, entre otros, el almendro, el manzano, el olivo, los cítricos y el aguacate. En España, el cultivo del aguacate se ha desarrollado y extendido ampliamente en la costa andaluza, destacando las provincias de Málaga y Granada, fundamentalmente debido a las condiciones climáticas singulares de esta región, que permiten un desarrollo idóneo de este cultivo. Actualmente, esta región andaluza cuenta con más de 15.000 hectáreas de este cultivo tan preciado, facturando en la campaña 2019/2020 más de 180 millones de euros (ASAJA Málaga, 2021).

En los últimos años, este cultivo se está viendo amenazado por la presencia de diferentes organismos patógenos, destacando el hongo *R. necatrix*, agente causal de la

podredumbre blanca radicular, enfermedad emergente en esta región debido principalmente a que las condiciones ambientales para el cultivo del aguacate, también son favorables para el desarrollo de este hongo fitopatógeno, y a que previamente en esta región se han cultivado otras plantas leñosas susceptibles a este hongo fitopatógeno, como son la vid, el almendro y el olivo (Pliego y col., 2012). La sintomatología típica producida por la podredumbre blanca radicular del aguacate comienza con síntomas aéreos de amarilleamiento de la copa del árbol, que posteriormente continua con la marchitez y el secado de las hojas. El conjunto de estos síntomas hace se produzca una pérdida de vigor del árbol, y que en casos extremos conduce a la muerte de la planta. En la figura 1 se muestra el aspecto de un árbol sano y uno que muestra síntomas de podredumbre blanca radicular, tanto en el campo (Fig. 1 A y B) como en un ensayo in vitro (Fig. 1 C y D).

El control de la podredumbre blanca radicular es muy complejo debido a que este hongo fitopatógeno puede sobrevivir en los suelos, presenta un amplio rango de huéspedes, además de ser tolerante a muchos fungicidas comunes (ten Hoopen y Krauss, 2006). Actualmente existen diferentes estrategias de control, destacando los métodos de control químico y el uso de hongos y bacterias como agentes de control biológico. El control mediante métodos físicos como la solarización ha demostrado ser eficiente bajo ciertas condiciones (López-Herrera y col., 1998). En cuanto al control químico, el fungicida de contacto fluzinam ha presentado eficacia en experimentos contra la podredumbre blanca radicular en plantas jóvenes (López-Herrera y Zea Bonilla, 2007). Recientemente se ha evaluado la capacidad de este fungicida de contacto para controlar la enfermedad mediante la aplicación de inyecciones de suelo (Arjona-López y col., 2020). Esta nueva técnica de aplicación hace que se disminuya significativamente el inóculo del hongo patógeno una vez que el fungicida ha sido aplicado.



Figura 1. Síntomas típicos de podredumbre blanca radicular del aguacate causada por el hongo *Rosellinia necatrix*. A) árbol sano de aguacate; B) árbol de aguacate con síntomas de podredumbre blanca radicular; C) Planta sana de aguacate; D) Planta de aguacate infectada experimentalmente con *Rosellinia necatrix* con síntomas típicos de la podredumbre blanca radicular.

Por otro lado, el uso de agentes de control biológico contra patógenos de plantas ha aumentado significativamente en los últimos años, debido principalmente a que son tratamientos sostenibles, compatibles con la agricultura ecológica y que evitan problemas tradicionalmente asociados al control químico, como son la contaminación de suelos y problemas de bioacumulación en fruto. Para el control biológico de enfermedades del aguacate, se han estudiado varias cepas de hongos pertenecientes al género *Trichoderma*, que han mostrado ser eficaces para el control de la podredumbre blanca radicular cuando se han aplicado tanto de manera independiente como combinadas sobre plantas jóvenes de aguacate previamente infectadas experimentalmente con *R. necatrix* (Ruano-Rosa y López-Herrera, 2009) En cuanto al uso de bacterias como agentes de control biológico frente a *R. necatrix*, estudios previos han descrito cepas bacterianas pertenecientes a diferentes géneros y especies (*Pantoea agglomerans*, *Agrobacterium sp.* y *Bacillus sp.*) que podrían ser potenciales agentes de control biológico gracias a su actividad antagonista.

Sin embargo, no ha sido hasta estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación, que han permitido centrarse en cepas bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas*, un grupo de bacterias ampliamente distribuido en distintos ecosistemas (incluyendo los agrícolas), que presentan una amplia diversidad metabólica que les permite producir compuestos derivados de su metabolismo muy interesantes desde el punto de vista biotecnológico y agroalimentario, y que además promueven actividades beneficiosas para las plantas (Pliego y col. 2007). Una de estas cepas bacterianas, es la cepa de *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606, que ha sido objeto de estudio como cepa modelo de control biológico por nuestro grupo de investigación desde hace más de 10 años. A continuación, se detallan cuáles son las características que hacen de esta bacteria un fantástico aliado para el control de la podredumbre blanca radicular del aguacate.

***Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 como agente de control biológico frente a *Rosellinia necatrix*: aislamiento, selección y caracterización**

El aislamiento y selección de la cepa bacteriana *P. chlororaphis* PCL1606, se llevó a cabo mediante la búsqueda de microorganismos con capacidad de control biológico en un área de árboles de aguacate que se encontraba gravemente afectada por *R. necatrix*. Dentro de esa zona, se seleccionaron árboles asintomáticos y desde las raíces y rizosfera de estos árboles se procedió a la obtención de una colección de 905 aislados bacterianos. Para determinar cuáles de estos aislados podrían ser agentes potenciales de control biológico, se rastrearon las cepas que poseían unos de los principales modos de acción de las bacterias con actividad de control biológico como es el antagonismo. Muchos de los aislados obtenidos mostraron actividad antagonista frente a *R. necatrix*, y pertenecían en su mayoría a diferentes especies del género *Pseudomonas* (Cazorla y col., 2006). Además, estas cepas bacterianas también mostraron ser antagonistas frente a otros hongos fitopatógenos de suelo, mediante la producción de diferentes compuestos antifúngicos, muchos de ellos previamente descritos en otros trabajos de investigación en diferentes especies del género *Pseudomonas*. Cabe destacar que la cepa bacteriana *P. chlororaphis* PCL1606 mostraba la peculiaridad de producir el antifúngico 2-hexil, 5-propil resorcinol (HPR), y que era la que más reducía el índice de enfermedad provocado por *R. necatrix*.

Gracias a este trabajo inicial llevado a cabo por Cazorla y col. (2006), se permitió la selección por nuestro grupo de investigación de *P. chlororaphis* PCL1606 como cepa modelo de estudio de la actividad de control biológico. A partir de ese momento, los esfuerzos llevados a cabo por nuestro grupo han desvelado los diferentes mecanismos que utiliza *P. chlororaphis* PCL1606 para luchar contra *R. necatrix*, y que hacen de esta cepa bacteriana un gran aliado en la lucha contra la podredumbre blanca radicular del aguacate (Arrebola y col., 2019), así como de otras enfermedades provocadas por hongos de suelo. Los diferentes mecanismos de acción que presenta *P. chlororaphis* PCL1606 se detallan a continuación.

***Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 como agente de control biológico frente a *Rosellinia necatrix*: análisis de los mecanismos de acción**

Los trabajos de investigación realizados por nuestro grupo hasta el momento, han identificado diferentes mecanismos de acción que presenta la cepa modelo *P. chlororaphis* PCL1606 frente a la podredumbre blanca radicular del aguacate, y que hacen de esta bacteria un excelente candidato como agente de control biológico (Figura 2). Como se ha comentado anteriormente esta cepa bacteriana presenta una fuerte actividad antagonista frente a *R. necatrix* (Fig. 2A) y frente a otros hongos fitopatógenos de especial relevancia. Además, se demostró que *P. chlororaphis* PCL1606 presenta una buena actividad de control biológico frente a la podredumbre blanca radicular (Fig. 2B) reduciendo significativamente el índice de enfermedad en ensayos con plantas de aguacate artificialmente infectadas con *R. necatrix*. Mediante estudios de ingeniería genética, se pudo relacionar la capacidad antagonista y de biocontrol de esta bacteria con la producción del antifúngico HPR (Cazorla y col., 2006). En un estudio posterior, y apoyado en trabajos previos que describieron los genes involucrados en la producción del antifúngico HPR (Nowak-Thompson y col., 2003), se identificaron las bases genéticas y moleculares de la producción del antifúngico HPR en *P. chlororaphis* PCL1606 (Calderón y col., 2013), identificando los genes *dar* como los responsables de la biosíntesis del compuesto antifúngico HPR. Este grupo de genes está formado por los genes biosintéticos *darA*, *darB* y *darC*, y los genes reguladores *darR* y *darS* (Fig. 2C). La construcción de mutantes específicos en los genes *darA* y *darB* no producían el antifúngico HPR, y también veían comprometida su actividad de control biológico (Calderón y col., 2013), mostrando al HPR como el compuesto clave en estas actividades beneficiosas. Pero como se va a describir a continuación, el HPR no solo podría funcionar como antifúngico, sino que podría estar jugando un papel clave como molécula señal regulando otros procesos relevantes en la biología de *P. chlororaphis* PCL1606.

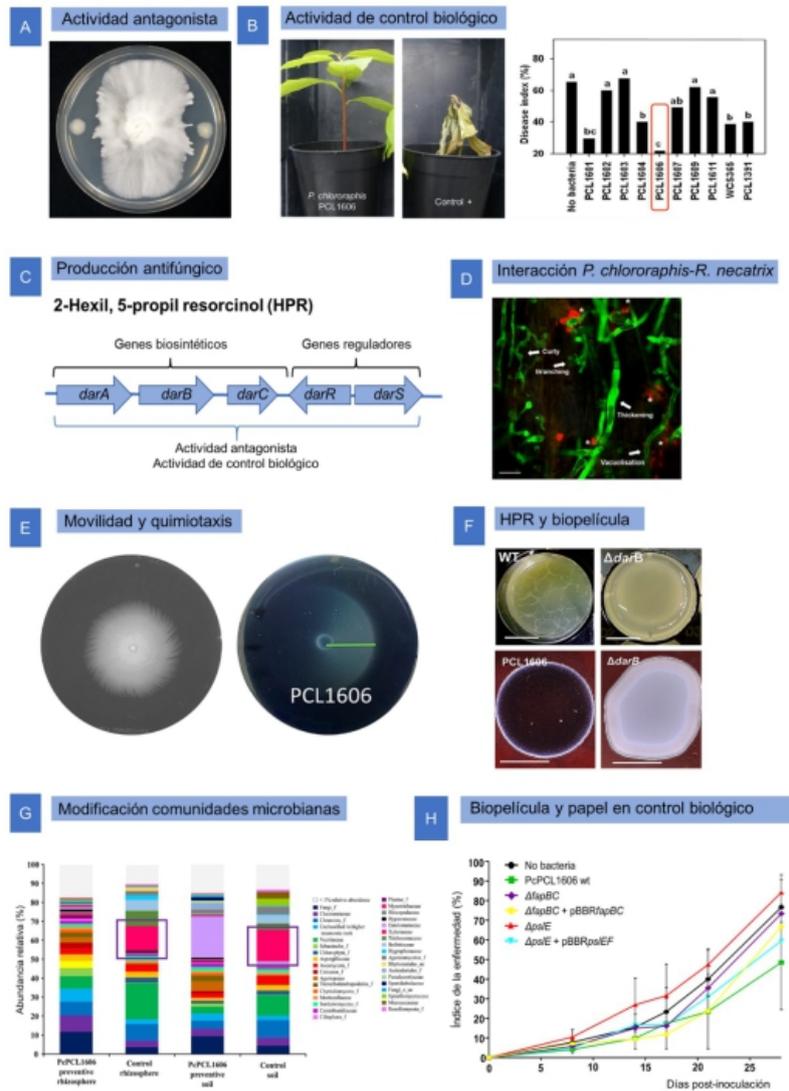


Figura 2. Modos de acción de la cepa bacteriana *P. chlororaphis* PCL1606. A) actividad antagonista frente a *Rosellinia necatrix*; B) Actividad de control biológico frente a la podredumbre blanca radicular del aguacate. *P. chlororaphis* PCL1606 marcada en rojo es la cepa bacteriana que presenta mayor reducción del índice de enfermedad; C) el antifúngico HPR se sintetiza gracias los genes *dar*, *darA*, *darB* y *darC* que son los genes biosintéticos, y *darR* y *darS*, que son los genes reguladores; D) *P. chlororaphis* PCL1606 interacciona con las hifas del hongo *Rosellinia necatrix* produciendo daños como son entre otros, engrosamientos o vacuolizaciones en las hifas fúngicas; E) *P. chlororaphis* PCL1606 es móvil y presenta atracción hacia los exudados de aguacate como a exudados de *Rosellinia necatrix*; F) HPR juega un papel relevante en la formación de la biopelícula de *P. chlororaphis* PCL1606; G) La adición exógena de *P. chlororaphis* PCL1606 en suelo tiene un impacto en las comunidades microbianas eucariotas, reduciendo a *Rosellinia necatrix* cuando está presente; H) La composición de la biopelícula de *P. chlororaphis* PCL1606 contiene dos exopolisacáridos y una proteína amiloide tipo *fap* que participan en la capacidad de control biológico de *P. chlororaphis* PCL1606.

El antifúngico HPR además de ser relevante para la actividad antagonista y el control biológico, ha demostrado ser muy importante la para colonización de la rizosfera de aguacate por parte de *P. chlororaphis* PCL1606 (Calderón y col., 2014), así como para la colonización de las hifas del hongo, donde produce daños como el engrosamiento y vacuolizaciones de las hifas (Fig. 2D). Esta cepa bacteriana es móvil (Vida y col., 2017), característica relevante para un agente de control biológico, y además presenta

atracción hacia exudados del hongo *R. necatrix* y de raíces de aguacate (Fig. 2E) (Polonio y col., 2017). Esta atracción hacia ambos exudados revela que *P. chlororaphis* PCL1606 es capaz de detectar la cercanía de la raíz o del micelio del hongo, y puede moverse de manera activa hacia ambos nichos cuando lo necesite. Si se mueve hacia la raíz, lleva a cabo un proceso de colonización de la superficie radicular, protegiéndola del ataque de otros organismos, pero si se mueve hacia el micelio del hongo, promueve un ataque directo sobre el mismo.

Por otro lado, la capacidad de formar biopelículas estables promueve un proceso de colonización efectiva, y es una de las características más importantes para un agente de control biológico (Pandin y col., 2017). En este sentido, el HPR ha mostrado ser crucial para la formación de la biopelícula de *P. chlororaphis* PCL1606 (Fig. 2F), actuando, así como molécula señal de otras actividades beneficiosas para la planta, independientemente del antagonismo que provoca (Calderón y col., 2019). *P. chlororaphis* PCL1606 es una rizobacteria aislada de rizosfera (porción de suelo íntimamente unido a la raíz) de aguacate. Es un estudio reciente, se ha formulado la cepa *P. chlororaphis* PCL1606 y se ha aplicado como tratamiento experimental directamente al suelo, y se ha observado el efecto sobre las comunidades microbianas del aguacate.

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que una aplicación de *P. chlororaphis* PCL1606 no tiene un impacto sobre las comunidades microbianas autóctonas (Fig. 2G), ni bacterias ni hongos, cuando *R. necatrix* no está presente. Sin embargo, cuando *R. necatrix* está presente, esta aplicación de la bacteria *P. chlororaphis* PCL1606 tiene un impacto en comunidades microbianas específicas, principalmente de hongos de la familia Xylariaceae, que es la familia a la que pertenece *R. necatrix*, mostrando una actividad selectiva de control frente a este patógeno (Tienda et al., 2020).

Finalmente, en un último estudio llevado a cabo por nuestro grupo sobre esta cepa bacteriana, se han analizado que componentes estructurales forman parte de la biopelícula de PCL1606 y que participarían de aspectos como la colonización y el control biológico, y se ha identificado cuales son los componentes relevantes para mantener la arquitectura de la biopelícula (Heredia-Ponce y col., 2021). Un exopolisacárido tipo Psl, y una proteína amiloide tipo fap, presentan papeles relevantes tanto en adhesión temprana como en la formación biopelículas. Además, mediante la generación de mutantes en ambos componentes, se ha observado como ambos juegan un papel relevante en la actividad de control biológico de *P. chlororaphis* PCL1606 (Fig. 2H).

En la actualidad, está trabajando en analizar otros modos de acción complementarios que *P. chlororaphis* PCL1606 podría presentar para luchar contra *R. necatrix*, y que, junto a los anteriormente descritos, no hace más que validar el interés de *P. chlororaphis* PCL1606 como agente de control biológico de la podredumbre blanca radicular del aguacate.

Agradecimientos

Estos trabajos sobre la cepa *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 han sido financiados por distintos proyectos obtenidos en el Plan Nacional de Investigación I+D+i del Ministerio de Economía, destacando los Proyectos AGL2011-30354-C02-1, AGL2014-52518-C2-1-R, AGL2017-83368-C2-1-R, además del Proyecto UMA18-FEDERJA-046 de la Junta de Andalucía, y todos ellos cofinanciados con fondos FEDER (UE).

Bibliografía

Arjona-López y col., 2020. *Crop Protection*, Vol. 131, 105100.

Arrebola y col., 2019. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 10, article 719.

ASAJA Málaga, 14-05-2021. <https://www.asajamalaga.com>

Calderón y col., 2013. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 26, 554-565.

Calderón y col., 2014. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 89, 20-31.

Calderón y col., 2019. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 10, article 396.

Cazorla y col., 2006. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 19, 418-428.

Heredia-Ponce y col., 2021. *Environmental Microbiology*. Vol. 23, 2086-2101.

López-Herrera y col., 1998. *Plant Disease*. Vol. 82, 1088-1092.

López-Herrera y Zea Bonilla, 2007. *Crop Protection*. Vol. 26, 1186-1192.

Nowak-Thompson y col., 2003. *Journal of Bacteriology*. Vol. 185, 860-869.

Pandin y col., 2017. *Microbial Biotechnology*. Vol. 10, 719-734.

Pliego y col. 2007. *Research in Microbiology*. Vol. 158, 463-470.

Pliego y col., 2012. *Molecular Plant Pathology*. Vol. 13, 226-239.

Polonio y col., 2017. *International Microbiology*. Vol. 20, 95-104.

Ruano-Rosa y López-Herrera, 2009. *Biological Control*. Vol. 51, 66-71.

ten Hoopen y Krauss, 2006. *Crop Protection*. Vol. 25, 89-107.

Tienda y col., 2020. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 11, article 1874.

Vida y col., 2017. *PHYTOMA España*. N° 287, Marzo.