

CONTROL BIOLÓGICO DE PATÓGENOS DE PINO (*Pinus spp.*) CON UNA NUEVA ESPECIE DE HONGO, *Ceratobasidium albasitensis* (RHIZOCTONIA BINUCLEADA) PROCEDENTE DE ALBACETE

V. GONZÁLEZ¹, M.A. PORTAL¹, J. SÁNCHEZ-BALLESTEROS², F. ARENAL², M. VILLARREAL², C. DEL MORAL², H. LÓPEZ-CÓRCOLES³, P. LÓPEZ-FUSTER³ & V. RUBIO².

¹Mycetus Biotechnology, Polígono Industrial Campollano, calle C nº 4, 02007 Albacete.

²Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología CNB-CSIC, Campus de Cantoblanco - UAM, 28049 Madrid.

³Instituto Técnico Agronómico provincial, ITAP, S.A. Albacete.

RESUMEN

El presente trabajo muestra los resultados de una serie de ensayos de protección en pino, llevados a cabo con varios aislados pertenecientes a una nueva especie del complejo de hongos *Rhizoctonia*: *C.albasitensis* V.González & V.Rubio. Como patógenos se emplearon cepas de *R.solani* AG-4, aisladas de invernaderos productores de planta forestal en Cazorla (España) responsables de ocasionar la enfermedad conocida con el nombre de tumbado o “damping-off”. Estos experimentos se realizaron a escala de laboratorio e invernadero, observándose en ambos casos altas tasas de protección biológica. Con anterioridad a tales experimentos de protección, se dispusieron una serie de tests de patogenicidad que confirmaron la hipovirulencia de los aislados supuestamente protectores para las plántulas de pino.

SUMMARY

The present contribution shows results from protection tests against damping-off on pine seedlings, performed with several isolates belonging to a new binucleate *Rhizoctonia* (Genus *Ceratobasidium* Rogers) species: *C.albasitensis* V.González & V.Rubio. Those experiments were against several virulent *R.solani* AG-4 strains, isolated from pine nurseries in Cazorla (Spain), and were conducted in both greenhouse and laboratory scale. Very high rates of protection were observed in both experimental designs. Prior to the biocontrol assays, a set of pathogenicity tests (carried out at scale laboratory) were performed to test the hypovirulence of the supposedly protective strains against pine seedlings.

Palabras clave: Protección biológica, pino, semilleros, *Rhizoctonia* multinucleada, *Rhizoctonia* binucleada, *Ceratobasidium*.

Keywords: Biological control, Pine, nurseries, multinucleate *Rhizoctonia*, binucleate *Rhizoctonia*, *Ceratobasidium*.

INTRODUCCIÓN

El llamado género-forma *Rhizoctonia*, es considerado hoy en día como un conjunto morfológica y taxonómicamente heterogéneo de hongos filamentosos que no producen esporas asexuales, y que comparten un cierto número de caracteres en común, referidos generalmente a aspectos macro y micromorfológicos de sus estados anamórficos. Los organismos que integran este complejo, son hongos de suelo asociados a raíces, generalmente patógenos, aunque también existen especies saprofitas y un número considerable de táxones asociados rizotróficamente a orquídeas. Las enfermedades atribuidas a *Rhizoctonia* en hortícolas, frutales, cultivos, invernaderos, etc., causan habitualmente grandes pérdidas económicas en la agricultura y la industria forestal. Numerosos aislados de este complejo, atacan a un amplísimo rango de hospedadores, provocándoles numerosas patologías, tales como podredumbre de semillas y raíces, necrosis de frutos, tumbado de plántulas, etc.

En lo referente a la importancia forestal del denominado “damping-off”, ésta es una patología común de semillas y plántulas de muchas especies forestales, incluyendo varias coníferas. Se conoce desde hace mucho tiempo la relación entre bastantes anamorfos atribuidos a *R.solani* Kühn y el damping-off de semillas de coníferas (WIANT, 1929). El grupo de anastomosis de *R.solani* más comúnmente asociado a este tipo de patología en coníferas es AG-4 (HIETALA & SEN, 1996). Algunos estudios (i.e. PERRIN & SAMPANGI, 1986), indican que las plántulas crecidas directamente en camas de semilleros son más susceptibles al tumbado provocado por el ataque de aislados virulentos, que aquellas dispuestas en contenedores que incorporan sustratos inertes tipo turba. La infectividad de estos aislados de *R. solani*, depende estrechamente de sus condiciones de prevalencia en el suelo, tales como PH, temperatura, humedad, etc. (ROTH & RIKER, 1943; CAMPOROTA & PERRIN, 1994). La fumigación del suelo, y el tratamiento de las semillas con fungicida, han sido habitualmente recomendados como medidas de prevención de esta enfermedad.

Desde hace unos años, se han venido realizando estudios sobre el uso de especies de *Ceratobasidium* (*Rhizoctonia* binucleada) como agentes de biocontrol, frente a aislados patógenos de *R. solani* y otros hongos. Así, se han descrito fenómenos de protección biológica con este tipo de hongos en un amplio rango de especies vegetales (SNEH, 1996). Sin embargo, los intentos de control biológico de damping-off en coníferas mediante el empleo de estos agentes de biocontrol han sido escasos hasta la actualidad (HIETALA & SEN, 1996).

Se ha visto como diferentes aislados hipovirulentos, muestran diferentes capacidades de protección, lo que hace pensar en la existencia de diferentes modos o mecanismos de acción. Asimismo, se cree que en los efectos de protección

de un aislado dado, puedan estar implicados uno o más mecanismos simultáneamente. Aunque no se conoce mucho sobre estos mecanismos de protección, se postulan dos grandes grupos de efectos de protección (SNEH, 1998); un primer grupo lo constituirían las interacciones directas, en las que podrían estar implicados mecanismos de transmisión de dsRNA, o fenómenos de antagonismo directo (lo que podría manifestarse como competencia por nutrientes, sitios de infección, antibiosis, hiperparasitismo, etc.). Un segundo grupo serían las interacciones indirectas, como la formación de barreras físicas, o la producción por parte de los aislados hipovirulentos de enzimas líticas y/o sustancias inhibitorias (tipo fitoalexinas o fenoles). Con posterioridad, ha sido demostrada la inducción de resistencia sistémica en determinadas especies vegetales infectadas con aislados protectores (POROMARTO *et al.*, 1998; JABAJI-HARE *et al.*, 1999). También se ha observado la capacidad de algunos aislados hipovirulentos para promover (e incrementar) el crecimiento de ciertas plantas, incluso en ausencia de patógenos. Dichos efectos suelen ser expresados en términos de incremento de tamaño y en rendimiento de cosecha para las diferentes especies vegetales ensayadas (SNEH *et al.*, 1986).

MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayo n° 1 (*Pinus halepensis*) (escala de laboratorio)

2 cepas de *Ceratobasidium albasitensis*, **Eab-F2** y **Eab-aB** fueron ensayadas en *Pinus halepensis* Miller contra dos cepas de *R. solani* AG4, **meloni 8.2** y **pin**. La primera de las cepas fue seleccionada en base a su comportamiento altamente patogénico frente a numerosas especies vegetales ensayadas en nuestro laboratorio (datos no mostrados). El segundo patógeno escogido fue aislado de pino en semilleros comerciales de pino. Los ensayos se llevaron a cabo tanto en placas petri como en frascos de propagación "in vitro" con agar-agua 1.5% como medio nutritivo, conteniendo una (en el caso de los frascos) o dos plántulas (en las placas petri) de pino. Las semillas fueron previamente esterilizadas y pregerminadas según el siguiente protocolo: semillas de *P. halepensis* fueron sumergidas 36 horas en agua destilada estéril a 5°C, después lavadas durante 5 minutos en una solución que contenía 100 ml de agua estéril y 3 gotas de Tween 80. Tras esto, fueron lavadas de nuevo (al menos 3 lavados) y posteriormente sumergidas durante 15 minutos en una solución de H₂O₂ al 30%. Finalmente, las semillas fueron lavadas 3 veces con agua destilada estéril y colocadas (15-20 semillas por placa) en placas petri que contenían agar-agua 1.5%, siendo incubadas invertidas y en oscuridad a 21°C durante aproximadamente 14 días. Una vez germinadas, fueron transferidas a placas y frascos donde los aislados patógenos fueron inoculados en 2 momentos con respecto a las cepas protectoras; simultáneamente junto éstas, ó 7 días después.

Ensayo n° 2 *Pinus halepensis* (escala de invernadero)

Los ensayos de protección biológica con *Rhizoctonia* binucleada a escala de invernadero en pino, fueron realizados en las instalaciones del Instituto Técnico Agronómico Provincial (ITAP) en la finca experimental de Las Tiesas en Albacete. Para estos experimentos se utilizaron como supuestas protectoras las cepas de *Rhizoctonia* binucleada **Eab-aB** (*Ceratobasidium sp.*) y **Eab-F2** (*C. albasitensis*), frente a la cepa de *R. solani* AG4 **pin**, aislada de pino en la Sierra de Cazorla (Jaen). Los diseños fueron dispuestos en bandejas de propagación en vivero de 54 alvéolos. En cada uno de dichos alvéolos fueron dispuestas entre 3-6 semillas de *Pinus halepensis* para reducir al máximo la existencia de marras. En el momento de la inoculación se produjo un aclareo en las bandejas, dejando finalmente 3 plántulas (de aproximadamente 3 cm de longitud media) por alvéolo en cada bandeja. El inóculo fúngico (tanto de los aislados protectores como patógenos) consistió en una suspensión del hongo, previamente propagado en medio líquido completo **CM** (5 g/l de extracto de malta; 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de glucosa) en agitación a 26°C durante 5-8 días. Se experimentó con dos momentos de inoculación; **simultáneamente**, añadiendo aislado protector y patógeno al mismo tiempo, y **sucesivamente**, inoculando la cepa patógena 21 días después de la incorporación de los aislados supuestamente protectores. Como variable adicional, algunas de las bandejas fueron tratadas con fungicida (utilizando para ello **Tiram**, fungicida empleado habitualmente para el control de *Rhizoctonia spp.*), de cara a evaluar y comparar los efectos de un tratamiento convencional frente al tratamiento con cepas protectoras de *Rhizoctonia* binucleada. Las primeras estimaciones y conteos fueron realizados 6 semanas después de la inoculación completa de todas las bandejas, y se continuaron realizando a las 9, 12 y 24 semanas. Las estimaciones se realizaban sobre el número de plántulas supervivientes, ya que en cada conteo se retiraban todas aquellas plántulas secas o severamente dañadas.

RESULTADOS

Escala de laboratorio

Los efectos de protección contra damping-off en pino a escala de laboratorio (placas petri y frascos de cultivo "in vitro") fueron expresados como estimación visual de la superficie de plántula infectada, incluyendo la presencia o ausencia de podredumbre en el cuello de la raíz y el subsecuente tumbado de la planta. Así, las fotografías muestran la virulencia en laboratorio de los aislados patogénicos empleados (*R. solani pin* y **meloni 8.2**) (fig. 1) para las plántulas de pino.

Fig. 1. Test de patogenicidad en laboratorio; izquierda: control (-) y *R. solani pin* (+); derecha: control (-) y *R. solani meloni 8.2* (+).



De otro lado, y de modo similar a como se pudo observar posteriormente en ensayos de protección en bandejas de cultivo de invernadero, los aislados Eab-aB y Eab-F2 de *Rhizoctonia* binucleada (*Ceratobasidium spp*) resultaron ser efectivos (fig. 2) en el control del ataque de los patógenos empleados, en los casos en donde dichas cepas protectoras fueron inoculadas días antes que los mencionados patógenos, lo que permitió una colonización previa del sistema radicular de las plántulas por parte de estos aislados binucleados.

Fig. 2. Test de protección en laboratorio en inoculación simultánea y sucesiva; izquierda: **Eab-F2/pin**; derecha: **Eab-F2/meloni 8.2**.

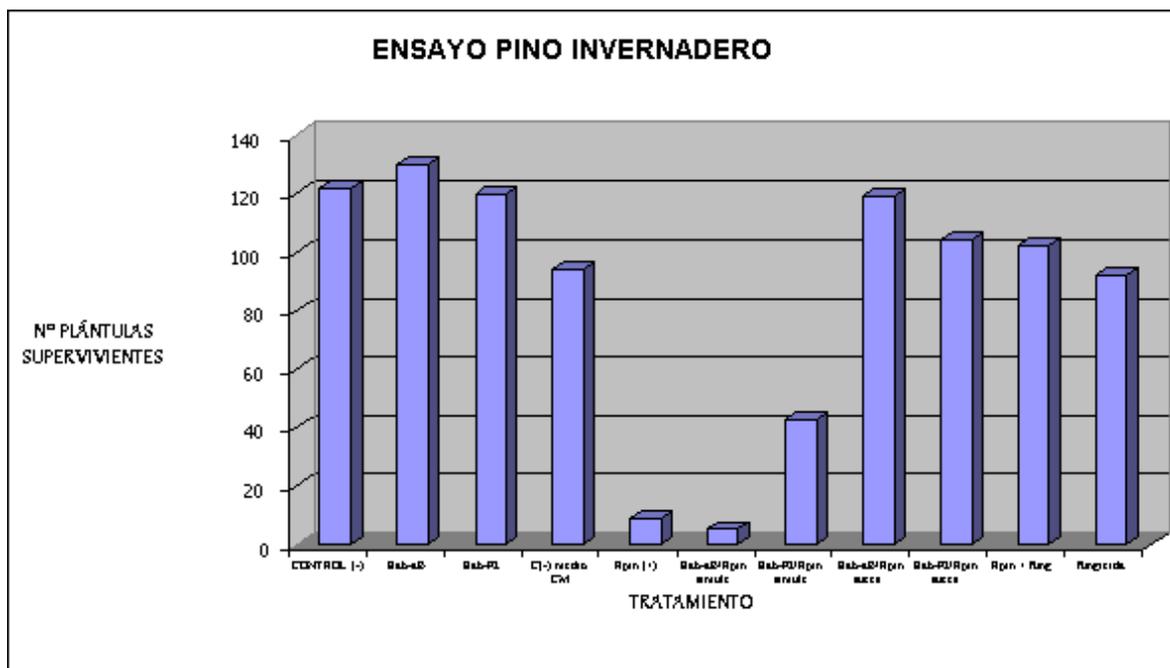


Escala de Invernadero

Tras la finalización de los ensayos de protección en pino a escala de invernadero, la efectividad en la protección fue estimada en función de los valores resultantes en los conteos de plántulas supervivientes a punto final. Dichos valores, así como todos los diferentes tratamientos aplicados en cada caso, quedan reflejados en la tabla 1.

Tabla y Fig. 1. Tratamientos y conteos finales de plántulas supervivientes en el ensayo de protección biológica con *Rhizoctonia* binucleada en Pino.

BANDEJA	TRATAMIENTO	Nº PLÁNTULAS SUPERVIVIENTES
1	CONTROL (-) Sin tratamiento alguno	122
2	Eab-aB	130
3	Eab-F2	120
4	CONTROL (-) Medio CM	94
5	CONTROL (+) pin	9
6	Eab-aB / pin. Inoculación simultánea	5
7	Eab-F2 / pin. Inoculación simultánea	43
8	Eab-aB / pin. Inoculación sucesiva	119
9	Eab-F2 / pin. Inoculación sucesiva	104
10	pin + fungicida	102
11	fungicida	92



Tras el análisis de los conteos anteriormente expuestos, se comprobó en primer lugar, que la cepa de *R. solani* patógena escogida para el ensayo resultó altamente virulenta en pino (fig. 1). Este tipo de observaciones sugieren la existencia de una problemática fitopatológica real para los semilleros de pino en la zona de estudio. Por otra parte, los dos aislados supuestamente protectores elegidos resultaron ser completamente avirulentos o no patogénicos para pino, como se deduce de la comparación de los conteos entre los casos 2 y 3 (fig. 1) frente al supuesto 1.

Con respecto al efecto protector de ambas cepas, se observaron comportamientos diferenciales entre ambos aislados cuando su inoculación fue simultánea con respecto a la del patógeno. Así, **Eab-aB** no protegió frente a *R. solani pin* cuando se incorporó a las bandejas al mismo tiempo que ésta última cepa. Por otra parte, un ligero aumento de la supervivencia de plántulas (43 frente a 5) fue observado cuando **Eab-F2** fue inoculado conjuntamente con el patógeno.

Sin embargo, se registraron sensibles efectos de protección (en término de supervivencia de plántulas) en ambas cepas, cuando éstas fueron administradas algunas semanas después del patógeno (casos 8 y 9). De este modo, los valores en ambos casos estuvieron dentro del rango observado para el control negativo de bandejas sin tratamiento fúngico alguno, o en los casos en que se administró únicamente el aislado protector. Otro efecto destacable fue el observado en el caso donde se incorporó un tratamiento fungicida convencional (Tiram) frente a la cepa patógena, registrándose valores de supervivencia de plántulas similares a los obtenidos con el tratamiento basado en agentes de biocontrol.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los ensayos de biocontrol de damping-off, tanto a escala de laboratorio como en invernadero, probaron la avirulencia de las cepas supuestamente protectoras en las plántulas de pino. Así mismo, los ensayos posteriores demostraron la eficacia del empleo de tratamientos de control biológico basados en el uso de organismos fúngicos antagonistas de aquellos patógenos implicados en este tipo de patologías. Al igual que se ha reportado en otras especies vegetales (SNEH, 1996), algunos aislados avirulentos (de modo de vida mayoritariamente saprofítico) pertenecientes en su mayoría al denominado grupo de hongos basidiomicetos de *Rhizoctonia* binucleada (gén. *Ceratobasidium*), fueron capaces de proteger plántulas jóvenes de pino del ataque de cepas de *R. solani* AG4. Éstos efectos de protección observados para algunas de estas cepas de *Ceratobasidium spp.* han sido igualmente testados en nuestro laboratorio (datos no mostrados) en otras especies vegetales frente a un amplio rango de patógenos fúngicos comunes, no relacionados taxonómicamente con el complejo *Rhizoctonia* (i.e. *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Stemphylium spp.*, *Phytophthora spp.*, etc).

Como se deduce de la interpretación de los datos obtenidos con las dos escalas de experimentación ensayadas, las tasas de protección son sensiblemente incrementadas cuando la inoculación de los aislados protectores es realizada con anterioridad a la incorporación de la cepa patógena. Estas observaciones parecen estar relacionadas con el hecho de que los mecanismos que intervienen en la protección de estos hongos pudieran ser de tipo directo, donde una cierta ventaja en términos de colonización, competencia por sitios de infección o nutrientes por parte del aislado protector, resulte efectiva para impedir la entrada y desarrollo del patógeno. Algunos autores (SNEH, 1998) han apuntado que las especies saprófitas de *Ceratobasidium* en el suelo, suelen comportarse como colonizadores primarios de este medio, donde la supervivencia y permanencia de las poblaciones de estos hongos en el suelo esta condicionada por la entrada y el establecimiento de otros tipos de flora rizosférica. Además, es bien conocida la capacidad de este tipo de hongos para establecer asociaciones simbióticas con las raíces de algunas plantas (en especial con especies de *Orchidaceae*), lo que podría facilitar la interacción de estos aislados con los sistemas radiculares de las plantas ensayadas.

Aunque en la literatura han sido descritos suelos supresivos naturales o inducidos con organismos como el

hongo mitospórico *Trichoderma harzianum* Rifai (HENIS *et al.*, 1978), no se conocen aún ejemplos de suelos con poblaciones de hongos supresivas pertenecientes al género *Ceratobasidium*. No obstante, algunos autores (i.e. ROBERTS & SIVASITHAMPARAM, 1986) han señalado que en campos de trigo afectados por *R. solani*, el centro de las calvas en el cultivo estaba dominado por dicho hongo, mientras que las poblaciones de *Rhizoctonia* binucleada dominaban los márgenes de estas calvas, sugiriendo que estos aislados preexistentes en las parcelas agrícolas podrían estar implicados en el control de la extensión de estos calveros de enfermedad mediante fenómenos de antagonismo frente al patógeno *R. solani*. Algunos estudios (HUANG & KUHLMAN, 1990) han señalado que la vía de entrada principal en el suelo de organismos fúngicos causantes de damping-off en semilleros, parece debida al empleo de enmiendas orgánicas. Así, los tratamientos de semilla previos con agentes de biocontrol de origen fúngico, incorporados en las bandejas y contenedores en una forma de inóculo fácilmente mezclable con el sustrato de cultivo inerte, podrían representar una alternativa de control de la enfermedad, tanto en sistemas donde los trasplantes posteriores se efectúen en suelos que incorporen tratamientos químicos previos o no.

BIBLIOGRAFÍA

- CAMPOROTA, P. & PERRIN, R. (1994). *Survey for damping-off in forest nurseries in France. Preliminary results*. In: (PERRIN, R. & SUTHERLAND, J.R., eds.) *Diseases and insects in Forest nurseries*. Les colloques no. 68 (pp. 51-58). INRA, Paris.
- HENIS, Y., GHAFER, A. & BAKER, R. (1978). *Integrated control of Rhizoctonia solani damping-off of radish: Effect on successive plantings, PCNB and Trichoderma harzianum on pathogen and disease*. *Phytopathology* 68: 900-909.
- HIETALA, A.M. & SEN, R. (1996). *Rhizoctonia associated with forest trees*. In: *Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. (SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S. & DIJST, G., eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- HUANG, J.W. & KUHLMAN, E.G. (1990). *Fungi associated with damping-off of slash pine seedlings in Georgia*. *Plant. Dis.* 74: 27-30.
- JABAJI-HARE, S., CHAMBERLAND, H. & CHAREST, P.M. (1999). *Cell wall alterations in hypocotyls of bean seedlings protected from Rhizoctonia stem canker by a binucleate Rhizoctonia isolate*. *Mycol. Res.* 103: 1035-1043.
- PERRIN, R. & SAMPANGI, R. (1986). *La fonte des semis en pépinière forestière*. *Eur. J. For. Path.* 16: 309-321.
- POROMARTO, S.H., NELSON, B.D. & FREEMAN, T.P. (1998). *Association of binucleate Rhizoctonia with soybean and mechanism of biocontrol of Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 88: 1056-1067.
- ROBERTS, D.L. & SIVASITHAMPARAM, K. (1986). *Identity and pathogenicity of Rhizoctonia spp. associated with bare patch disease of cereals at a field site in Western Australia*. *Neth. J. Pl. Path.* 92: 185-195.
- ROTH, L.F. & RIKER, A.J. (1943). *Seasonal development in the nursery of damping-off of red pine seedlings caused by Phytium and Rhizoctonia*. *J. Agric. Res.* 67: 417-431.
- SNEH, B. (1996). *Non pathogenic isolates of Rhizoctonia (np-R) spp. and their role in biological control*. In: *Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. (SNEH, B., JABAJI-HARE, S., NEATE, S. & DIJST, G., eds.). pp. 473-484. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- SNEH, B. (1998). *Use of non-pathogenic or hypovirulent fungal strains to protect plants against closely related fungal pathogens*. *Biotech. Adv.* 16: 1-32.
- SNEH, B., ZEIDAN, M., ICHIELEVICH-AUSTER, M., BARASH, I. & KOLTIN, Y. (1986). *Increased growth responses induced by a nonpathogenic Rhizoctonia solani*. *Can. J. Bot.* 64: 2372-2378.
- WIANT, J.S. (1929). *The Rhizoctonia solani damping-off of conifers, and its control by chemical treatments of the soil*. N. Y. (Cornell). *Agr. Exp. Sta. Mem.* 124. 64 pp.