

Premio Universitario de la SECF 2022 al Proyecto o Trabajo Fin de Carrera o de Grado

**Evaluación *in vitro* e *in vivo* de *Bacillus* spp.
como agente de control biológico
en el escaldado del alcornoque**

**In vitro and in vivo evaluation of *Bacillus* spp.
as a biological control agent against *Botryosphaeria* canker**

Albó-Timor, D.^{1*}; Colinas, C.^{1,2}; Muñoz-Adalia, E.J.^{1,3}

¹ *Centre de Ciència i Tecnologia Forestal de Catalunya (CTFC),
Carretera St. Llorenç de Morunys, km 2 Solsona, España*

² *Departamento de Ciencia e Ingeniería Forestal y Agrícola. Universidad de Lleida.
Av. de l'Alcalde Rovira Roure 191, 25198, Lleida, España*

³ *Departamento de Ciencias Agroforestales. Universidad de Valladolid.
Avenida de Madrid 57, 34004, Palencia, España*

* Autor de correspondencia: dalmau.albo@ctfc.cat

Resumen

El hongo causante del escaldado del alcornoque *Diplodia corticola* se asocia al decaimiento y pérdida de productividad de los rodales de alcornoque (*Quercus suber* L.). La no renovación por parte de la Unión Europea de los químicos usados hasta el momento en la prevención y control del hongo ha acelerado la búsqueda de alternativas efectivas y respetuosas con el medio ambiente. El objetivo principal de este estudio ha sido validar el potencial biocontrolador del género de bacterias *Bacillus* frente a *D. corticola*. En primera instancia, mediante un ensayo *in vitro* enfocado a confirmar el efecto antagonista de dos formulados bacterianos enfrentándolos en cultivo dual a siete cepas del hongo. En segundo lugar, mediante un estudio en invernadero y con plántulas de *Q. suber* inoculadas con el patógeno y los mismos tratamientos ensayados *in vitro*, con el fin de evaluar la virulencia del hongo y profundizar en la capacidad protectora de los formulados empleados. Los resultados obtenidos *in vitro* confirman el potencial biocontrolador de las bacterias a las concentraciones estudiadas. Además, sugieren mecanismos de antagonismo químico por parte de *Bacillus* spp. Estos resultados preliminares suponen un avance en la búsqueda de un agente de control biológico efectivo frente al escaldado.

Palabras clave: fitopatología, *Diplodia corticola*, escaldado, biocontrol, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mojavenensis*.

Abstract

The canker causing agent *Diplodia corticola* is associated to the decay and loss of productivity of cork oak stands (*Quercus suber* L.). The non-renewal of the chemical compounds used so far in the prevention and control of the fungus by the European Union has accelerated the search for effective and environmentally friendly alternatives. This study seeks to validate the biocontrol potential of the genus of bacteria *Bacillus* against *D. corticola*. First, with an *in vitro* study focusing to confirm the antagonist effect of two bacterial concentrates facing seven strains of the fungus in dual cultures. Second, through an *in vivo* assay with *Q. suber* seedling inoculated with the pathogen and the same formulates tested *in vitro*, aiming to evaluate the virulence of the fungus, and deepening in the protective capacity of the concentrates. The results obtained *in vitro* confirmed the biocontrol potential of the bacteria in the studied concentrations. Moreover, they suggest the existence of chemical antagonism associated with *Bacillus* spp. These preliminary results show the potential of biological control agents to face Botryosphaeria canker.

Keywords: phytopathology, *Diplodia corticola*, Botryosphaeria canker, biocontrol, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mojavenensis*.

1. Introducción

El decaimiento de las formaciones boscosas con alcornoque (*Quercus suber* L.) concentradas en la región mediterránea occidental (*Fig. 1*) (Corticeira Amorim, 2014; Mundet *et al.*, 2018) se asocia al abandono de la gestión de estas masas y a unas condiciones ambientales cambiantes que suponen un estrés para los árboles e impulsan la proliferación de patógenos que infectan a los ejemplares debilitados (Sierra-Pérez *et al.*, 2015; Vericat *et al.*, 2013).

De entre los patógenos mencionados, destaca el hongo ascomiceto *Diplodia corticola* A.J.L Phillips, A. Alves & J. Luque (Teleomorfo: *Botryosphaeria corticola*), causante de la patología comúnmente conocida como chancro o escaldado del alcornoque. El escaldado es considerado una de las enfermedades emergentes de mayor importancia económica a nivel europeo (Moricca *et al.*, 2016; Serrano *et al.*, 2015), pudiendo provocar la pérdida de más de un 60% de su rendimiento en producción en los rodales afectados (QualitySuber, 2019).

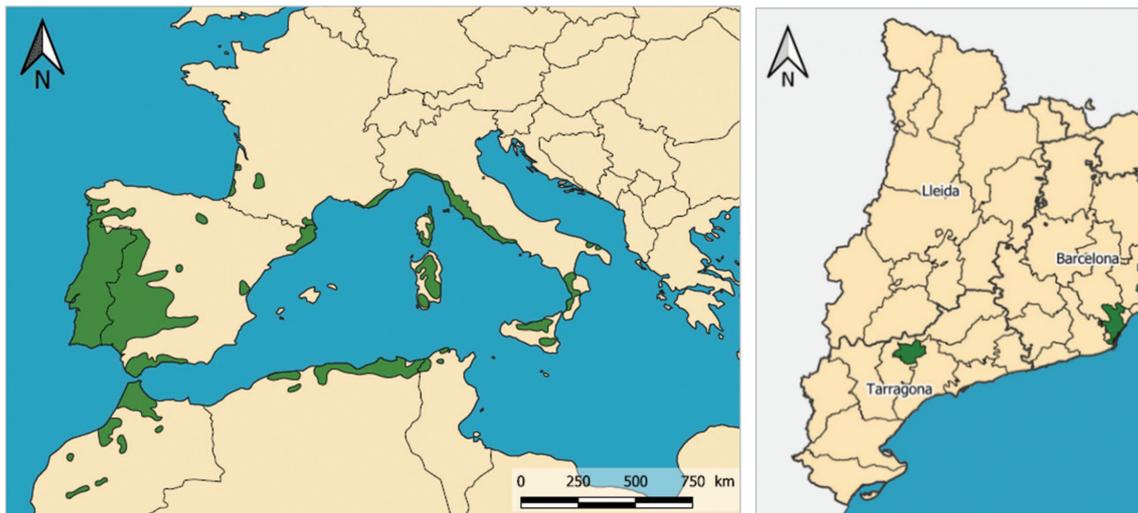


Figura 1. Distribución geográfica de los alcornocales de *Q. suber* en la Península Ibérica y la Cuenca Mediterránea (izquierda) y en Cataluña (derecha). Mapas elaborados con QGIS a partir de los datos procedentes de ©EuroGeographics for the administrative boundaries (03M, 2020), Base comarcal ICGC (2021) y Caudullo *et al.* (2017).

Las medidas de control más extendidas frente a esta patología han sido tradicionalmente de tipo químico [p.ej., Benomilo ($C_{14}H_{18}N_4O_3$), Carbendazim ($C_9H_9N_3O_2$) y Metil-Tiofanato ($C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$) (Luque *et al.*, 2008; Serrano *et al.*, 2015)]. Pese a los buenos resultados obtenidos por parte de estos tratamientos, su carácter inespecífico suscitó la prohibición de su uso por parte de la Comisión Europea (Redacción PHYTOMA-España, 2020). Ante esta situación, los propietarios y gestores forestales se encuentran sin opciones de tratamiento frente a la infección, lo que urge encontrar alternativas, preferentemente de base biológica y respetuosas con el medio ambiente, que permitan controlar los brotes de esta enfermedad en rodales productores de corcho.

En este contexto los Agentes de Control Biológico (BCA) se postulan como una alternativa de control (Aiello *et al.*, 2019; Carmona-Hernandez *et al.*, 2019; Dai *et al.*, 2021; Dimopoulou *et al.*, 2021; Fernández *et al.*, 2015). En esta línea, uno de los agentes biológicos que está ganando crédito en el control de patógenos fúngicos y bacterianos es el género de bacterias grampositivas *Bacillus* spp. (Dimopoulou *et al.*, 2021; Raaijmakers *et al.*, 2002; Raupach & Kloepper, 1998; Raza *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Pese a la existencia de algunos estudios que prueban su eficacia frente a patógenos forestales (Dai *et al.*, 2021; Muñoz-Adalia *et al.*, 2021), la investigación en este campo se encuentra aún en una fase incipiente por lo que es necesario seguir profundizando en la efectividad del agente empleado en condiciones de campo.

En este sentido, el presente trabajo persigue dos objetivos de investigación principales:

1. Mejorar el conocimiento existente sobre la biología y etiología del hongo *D. corticola*, aun escasamente conocidas.
2. Evaluar la viabilidad de varios formulados de *Bacillus* spp. como alternativas de control frente al chancro.

2. Material y métodos

La metodología puesta en práctica incluyó, en primer lugar, un ensayo *in vitro* que buscó verificar el efecto antagonista de dos formulados bacterianos en desarrollo comercial [Probelte S.A.U. (Murcia, España) (código: BAM: Solución de *B. amyloliquefaciens* (1×10^8 unidades formadoras de colonia $\cdot \text{mL}^{-1}$) y código: BMX: Solución mezcla de *B. amyloliquefaciens* + *B. mojavenensis* (ratio 1:1, 1×10^8 ufc $\cdot \text{mL}^{-1}$)], enfrentándolos en cultivo dual a siete cepas de *D. corticola*. En segundo lugar, se realizó un estudio *in vivo* con plántulas de *Q. suber* a las cuales se les inoculó el patógeno y los mismos tratamientos ensayados *in vitro*, con el fin de evaluar la virulencia del hongo en base a la sintomatología y los cambios fisiológicos sufridos por la planta durante la infección, y profundizar en la capacidad protectora de los formulados empleados.

El ensayo *in vitro* se basó en el cultivo dual en placa de Petri. Este proceso consistió en enfrentar separadamente las cepas *D. corticola* con los dos tratamientos bacterianos anteriormente comentados, en combinaciones de una cepa fúngica frente a un tipo de tratamiento bacteriano.

Durante el desarrollo del ensayo *in vitro* se midieron los radios representativos del crecimiento micelial hacia el tratamiento aplicado encima de un disco de papel estéril, mediante los cuales se calcularon un total de cinco índices de antagonismo: c (cm), Sc (cm), I (%), AI (%) y DAI (%) (Campanile *et al.*, 2007; Martínez-Álvarez *et al.*, 2016; Muñoz-Adalia *et al.*, 2021). Asimismo, se evaluó la tasa de esporulación del hongo en cultivo dual, pasados treinta días desde la inoculación (tres réplicas para cada tratamiento y cepa; $n=73$) mediante conteo de conidios en cámara Thoma.

El ensayo *in vivo* se llevó a cabo en condiciones de invernadero (15 ± 10 °C) durante 256 días empleando ciento cincuenta plántulas de alcornoque ($h = 54,6 \pm 12,9$ cm) de tres savias de edad como elementos a inocular. Las plántulas se inocularon por incisión en tallo a 5-6 cm del cuello de raíz. Los tratamientos aplicados a las plántulas experimentales, con cinco réplicas cada uno, consistieron en la inoculación individual de las siete cepas del hongo con cada uno de los dos formulados bacterianos, un control negativo (agua destilada estéril), un control positivo (cepa fúngica solamente) y un control de tratamiento bacteriano.

A lo largo del ensayo se monitorizaron dos variables fisiológicas en cada plántula de *Q. suber* de forma quincenal: la conductancia estomática (g_{sw} , $\text{mol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y el contenido total de clorofila. Con la misma frecuencia, se evaluó la sintomatología causada por *D. corticola* de acuerdo con Félix et al. (2017).

3. Resultados y discusión

De entre las variables evaluadas *in vitro*, los valores obtenidos para tres de los índices de antagonismo evaluados *in vitro* (c, I y AI) fueron significativamente inferiores en las placas en cultivo dual respecto las placas control (p-valor $<0,05$ en todos los casos). Estos resultados demuestran que los formulados bacterianos de las dos soluciones comerciales estudiadas (BAM y BMX) fueron capaces de reducir el crecimiento del hongo *D. corticola* en las condiciones de cultivo.

El análisis de la sintomatología en plántulas demostró que la inoculación del hongo, independientemente de la cepa empleada, provocaba la aparición de síntomas en la mayoría de los ejemplares y, en menor proporción, la muerte de algunos de ellos (Tab. 1). No se detectó mortalidad en los controles negativos. Por otro lado, el hecho que los controles bacterianos no causaran ningún daño en las plántulas sugiere la inocuidad del tratamiento sobre la planta hospedante.

Tabla 1. Registro de plántulas muertas y sintomáticas de las tratadas con los controles negativo (n=35) y positivo (n=35), y con el hongo y los tratamientos BAM (n=35) y BMX (n=35).

	Control negativo		Control positivo		BAM		BMX	
	Muertas	Sintomáticas	Muertas	Sintomáticas	Muertas	Sintomáticas	Muertas	Sintomáticas
Total	0	7	5	32	4	16	3	11
%	0,0	20,0	14,3	91,4	11,4	45,7	8,6	31,4

Por lo que se refiere a la eficacia biocontroladora de los BCAs usados, se observó una reducción clara del porcentaje de plantas sintomáticas respecto del control fúngico (BAM: 45,7%; BMX: 60%), lo que respaldaría el efecto protector de las bacterias frente a la infección del hongo.

Por lo que respecta a los datos fisiológicos, no se dio un efecto significativo generalizado de las cepas sobre el contenido de clorofila (SPAD) y la conductancia es-

tomática (g_{sw} , $\text{mol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). En consecuencia, los parámetros fisiológicos constituyen una extensión de lo que se había validado mediante el análisis de sintomatología.

4. Conclusiones

1. El ensayo *in vitro* ha confirmado el efecto antagonista de los formulados bacterianos frente a *D. corticola* en cultivo dual.
2. El ensayo *in vivo* ha confirmado la inocuidad de los tratamientos bacterianos sobre las plántulas de *Q. suber*. No obstante, su efecto protector frente al chancro parece estar limitado a la reducción de la severidad de los síntomas, siendo incapaz de reducir la mortalidad causada por las cepas más agresivas.
3. La caracterización de los componentes secretados por *Bacillus* spp. causantes del antagonismo observado merecen investigación en el futuro. Del mismo modo, los efectos del avance de la infección a nivel fisiológico requieren de un análisis más profundo que permita conocer la interacción bacteria-hongo-planta a nivel metabólico.

Agradecimientos/Financiación

Quiero agradecer muy sinceramente al Dr. E. Jordán Muñoz-Adalia, quien ha sido mi tutor en este trabajo, su gran dedicación y sus constantes soporte académico y moral, sin los cuales la realización de este proyecto no hubiese sido posible. Agradecer también la inestimable colaboración de los doctorandos Hanna Rathod Uppara y Andreu Meijer Mora, así como la del Dr. Carlos Colinas González, del Departamento de Ciencia e Ingeniería Forestal y Agrícola de la Universidad de Lleida (UdL).

Por otro lado, dar las gracias a la empresa Probelte S.A.U. por proporcionarnos los formulados bacterianos (BAM y BMX) usados en el presente estudio. Del mismo modo, agradecer especialmente al Dr. Artur Alves (Universidade de Aveiro, Portugal), sus consejos de experto y el aprovisionamiento de las cepas fúngicas (*Diplodia corticola*: CAA007-1, CAA008, CAA009, CAA010 y CAA500) empleadas en este trabajo.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia y amigos, por el soporte que me han dado a lo largo del proceso que ha supuesto la realización de este trabajo.

El presente estudio ha sido financiado parcialmente por la Generalitat de Catalunya, Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural y el Centre de Ciència i Tecnologia Forestal de Catalunya (CTFC).

5. Bibliografía

- Aiello, D.; Restuccia, C.; Stefani, E.; Vitale, A.; Cirvillieri, G.; 2019. Postharvest biocontrol ability of *Pseudomonas synxantha* against *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 149, 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.020>
- Campanile, G.; Ruscelli, A.; Luisi, N.; 2007. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and *in planta* tests. *European Journal of Plant Pathology*, 117(3), 237-246. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9089-1>
- Carmona-Hernandez, S.; Reyes-Pérez, J.J.; Chiquito-Contreras, R.G.; Rincon-Enriquez, G.; Cerdan-Cabrera, C.R.; Hernandez-Montiel, L.G.; 2019. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: a review. *Agronomy*, 9(3), 121. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>
- Corticeira Amorim, S.G.P.S.; S.A., 2014. *El arte del corcho: El corcho, una materia prima excepcional* (2ª Edición). Lidergraf.
- Dai, Y.; Wu, X.Q.; Wang, Y.H.; Zhu, M.L.; 2021. Biocontrol potential of *Bacillus pumilus* HR10 against *Sphaeropsis* shoot blight disease of pine. *Biological Control*, 152, 104458. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104458>
- Dimopoulou, A.; Theologidis, I.; Varympopi, A.; Papafotis, D.; Mermigka, G.; Tzima, A.; Panopoulos, N.J.; Skandalis, N.; 2021. Shifting Perspectives of Translational Research in Bio-Bactericides: Reviewing the *Bacillus amyloliquefaciens* Paradigm. *Biology*, 10(11), 1202. <https://doi.org/10.3390/biology10111202>
- Félix, C.; Pinto, G.; Amaral, J.; Fernandes, I.; Alves, A.; Esteves, A.C.; 2017. Strain-related pathogenicity in *Diplodia corticola*. *Forest Pathology*, 47(6), e12366. <https://doi.org/10.1111/efp.12366>
- Fernández, R.A.; 2015. *Antagonismo in vivo de hongos endófitos frente a Fusarium circinatum*. [Trabajo de fin de Máster, Universidad de Valladolid]. Repositorio Documental de la Universidad de Valladolid (UVadoc). <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/16517>
- Luque, J.; Pera, J.; Parladé, J.; 2008. Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria corticola* on cork oak in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology*, 38(3), 147-155. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00526.x>
- Martínez-Álvarez, P.; Fernández-González, R.A.; Sanz-Ros, A.V.; Pando, V.; Diez, J.J.; 2016. Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control*, 94, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.11.011>
- Moricca, S.; Linaldeddu, B.T.; Ginetti, B.; Scanu, B.; Franceschini, A.; Ragazzi, A.; 2016. Endemic and emerging pathogens threatening cork oak trees: Management options for conserving a unique forest ecosystem. *Plant Disease*, 100(11), 2184-2193. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0408-FE>
- Mundet, R.; Baiges, T.; Beltrán, M.; Torrell, A.; 2018. *Guía de recomendaciones y medidas de adaptación al cambio climático en la gestión de Quercus suber*. Proyecto Life+SUBER.
- Muñoz-Adalia, E.J.; Meijer, A.; Campillo-Brocal, J.C.; Colinas, C.; 2021. Antagonistic effect *in vitro* of three commercial strains of *Bacillus* sp. against the forest pathogen *Diplodia corticola*. *Forest Pathology*, 2021, e12711. <https://doi.org/10.1111/efp.12711>
- QualitySuber., 2019. *Contracte de compra de suro campanya 2019*. [Contrato de compra]. (p. 1-4). Santa Coloma de Farners.
- Raaijmakers, J.M.; Vlami, M.; De Souza, J.T.; 2002. Antibiotic production by bacterial biocon-

- trol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 537-547. <https://doi.org/10.1023/A:1020501420831>
- Raupach, G.S.; Kloepper, J.W.; 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88(11), 1158-1164. <https://doi.org/10.1094/PHTO.1998.88.11.1158>
- Raza, W.; Wang, J.; Wu, Y.; Ling, N.; Wei, Z.; Huang, Q.; Shen, Q.; 2016. Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(17), 7639-7650. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7584-7>
- Redacci3n PHYTOMA-España., 2020. *La Uni3n Europea no renueva el fungicida tiofanato-metil*. (5 de febrero de 2022). PHYTOMA-España: Sociedad editorial agr3cola y de organizaci3n de congresos especializada en Sanidad Vegetal. <https://www.phytoma.com/noticias/noticias-de-actualidad/la-ue-no-renueva-el-fungicida-tiofanato-metil>
- Serrano, M.S.; Romero, M.A.; Jim3nez, J.J.; De Vita, P.; Avila, A.; Trapero, A.; S3nchez, M.E.; 2015. Preventive control of *Botryosphaeria* canker affecting *Quercus suber* in southern Spain. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 88(4), 500-507. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpv016>
- Sierra-P3rez, J.; Boschmonart-Rives, J.; Gabarrell, X.; 2015. Production and trade analysis in the Iberian cork sector: Economic characterization of a forest industry. *Resources, conservation and recycling*, 98, 55-66. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2015.02.011>
- Vericat, P.; Beltr3n, M.; Piqu3, M.; Cervera, T.; 2013. Models de gesti3 per als boscos de sureira (*Quercus suber* L.)-Producci3 de suro i prevenci3 d'incendis forestals. *Generalitat de Catalunya. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentaci3 i Medi Natural. Centre de la Propietat Forestal, Barcelona (Spain)*.
- Zhang, M.; Li, J.; Shen, A.; Tan, S.; Yan, Z.; Yu, Y.; Zhaodong, X.; Tan, T.; Zeng, L.; 2016. Isolation and Identification of *Bacillus amyloliquefaciens* IBFCBF-1 with Potential for Biological Control of *Phytophthora* Blight and Growth Promotion of Pepper. *Journal of phytopathology*, 164(11-12), 1012-1021. <https://doi.org/10.1111/jph.12522>