



Biological control of fungi that cause almond wood diseases

Picos María Cinta*², Hernández Ana², Reyes Francisca¹, Camacho María³, Capote Nieves²

¹ Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica. Área de Microbiología. Universidad de Pablo de Olavide, Sevilla

² Laboratorio Biotecnología. Área de Protección Vegetal Sostenible, IFAPA las Torres. Alcalá del Río, Sevilla

³ Laboratorio de Inoculantes. Área de Recursos Naturales y Forestales, IFAPA las Torres. Alcalá del Río, Sevilla

INTRODUCCIÓN

Los hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* desarrollan enfermedades de madera en cultivos leñosos, como el almendro. Los síntomas consisten en chancros en tronco y ramas (Fig. 1A), gomosis (Fig 1B), necrosis de tejidos internos (Fig. 1C), decaimiento y, en ocasiones, muerte de la planta (Fig 1D)¹. Los métodos basados en control biológico son muy escasos o no efectivos^{2,3}. Por ello, el objetivo de este trabajo consistió en caracterizar dos colecciones de bacterias rizosféricas y endófitas como potenciales agentes de control biológico (ACB) de enfermedades de madera de almendro. Para ello, se estudió la capacidad antagonista de 29 cepas bacterianas sobre 4 especies de *Botryosphaeriaceae*: *Botryosphaeria dothidea* (Bd ALM 2), *Neofusicoccum parvum* (Np ALM 2), *Diplodia seriata* (Ds ALM2) y *Macrophomina phaseolinain* (MAV 4)

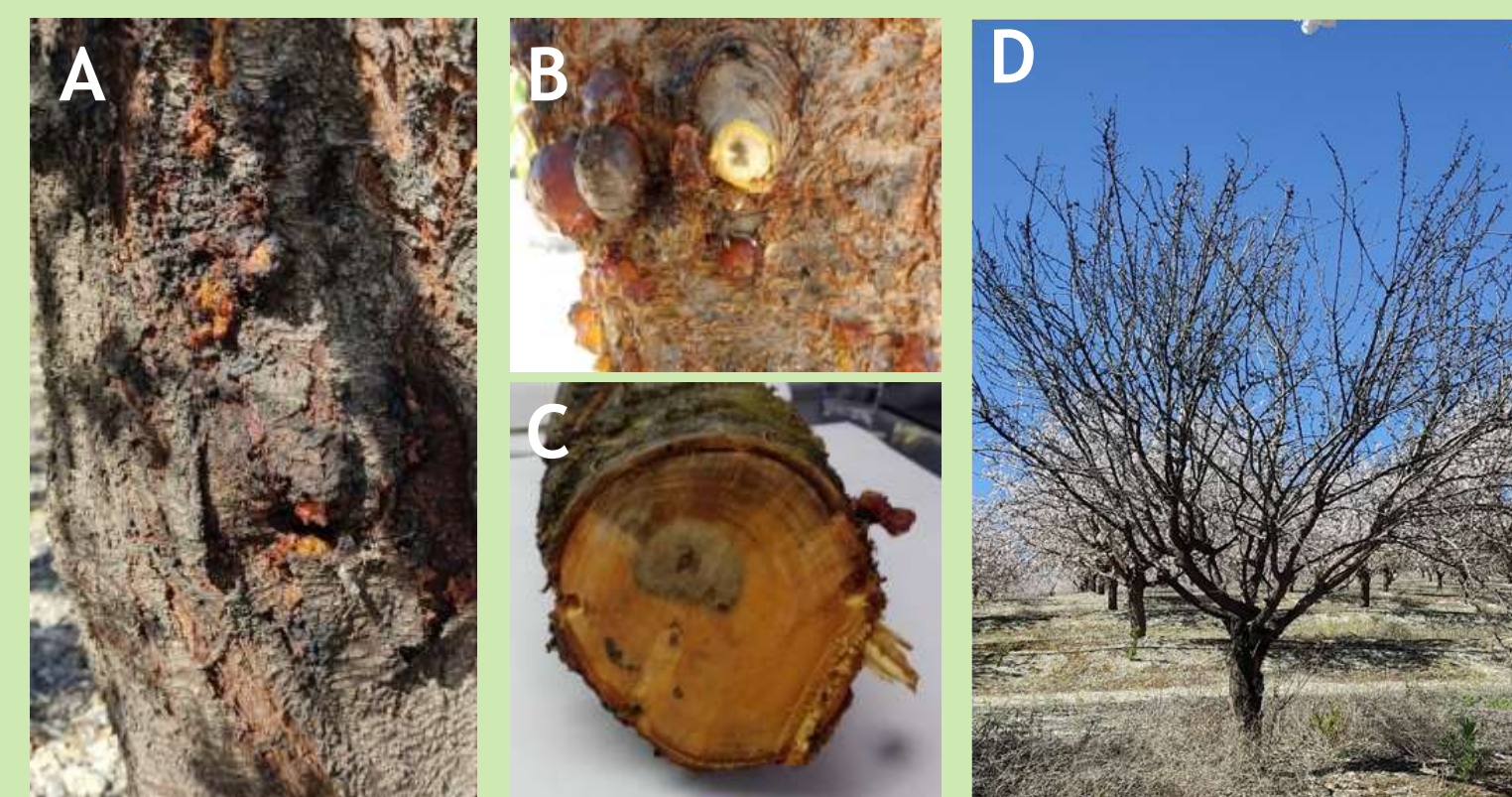


Fig. 1. Síntomas causados por hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* en almendro

METODOLOGÍA

❖ Caracterización de bacterias

Identificación molecular

- Extracción directa del ADN
- PCR del ADNr 16S
- Secuenciación ADNr 16S
- Comparación con bases de datos (EzBioCloud)

Evaluación de actividades enzimáticas:

- β-glucosidasas
- Lipasas

❖ **Enfrentamientos *in vitro***: Se dispensaron 4 gotas de 10 µL de suspensión bacteriana en la periferia de placas con medio NB y un botón de micelio del hongo en el centro. Incubación a 28°C en oscuridad. Medida del crecimiento micelar 7 días después de la inoculación y comparación con el control sin bacteria.

❖ **Enfrentamientos *in planta***: Se practicaron heridas a varetas escindidas de almendro y se inocularon con una suspensión bacteriana (10⁸ bacterias/ml) (A) y una semana después con una suspensión de hongo (10⁴ fragmentos de micelio/ml). Incubación en cámara húmeda a 28°C en oscuridad. Medida de las lesiones.

RESULTADOS

❖ **Actividades enzimáticas**: Las cepas Bel 1-1 de *Pantoea agglomerans*, Bel 1-4 de *Rhizobium soli*, Bel 2-6 de *Bacillus safensis* subsp. *Safensis*, Sol 1-3 de *Novosphingobium barchaimii* y Sol 1-4 de *Neobacillus niacini* son productoras de β-glucosidasa (Fig. 2A). En cambio, ninguna especie bacteriana es capaz de producir lipasas (Fig. 2B)

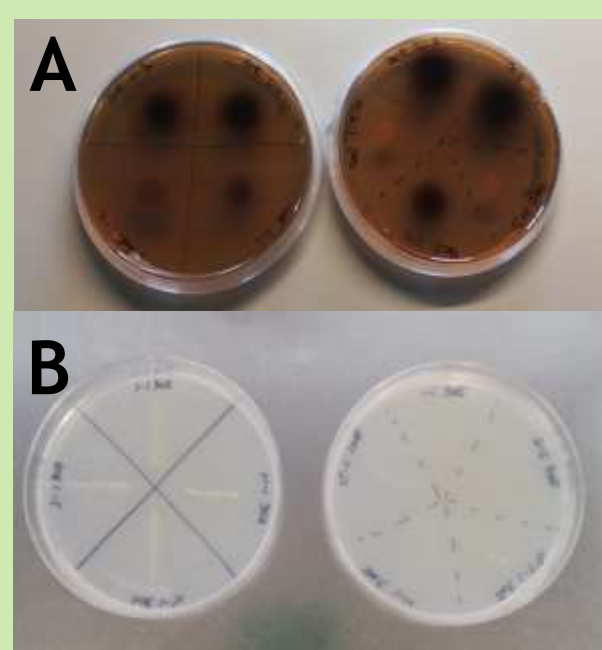


Fig. 2. Medidas *in vitro* de actividades β-glucosidasa (A) y lipasa (B)

❖ **Enfrentamientos duales *in vitro***: La cepa Sol 1-2 de *Bacillus mobilis* y la cepa Bel 2-6 de *B. safensis* subsp. *safensis* produjeron el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelar de las 4 especies de hongos patógenos de almendro (Fig. 3A y 3B)

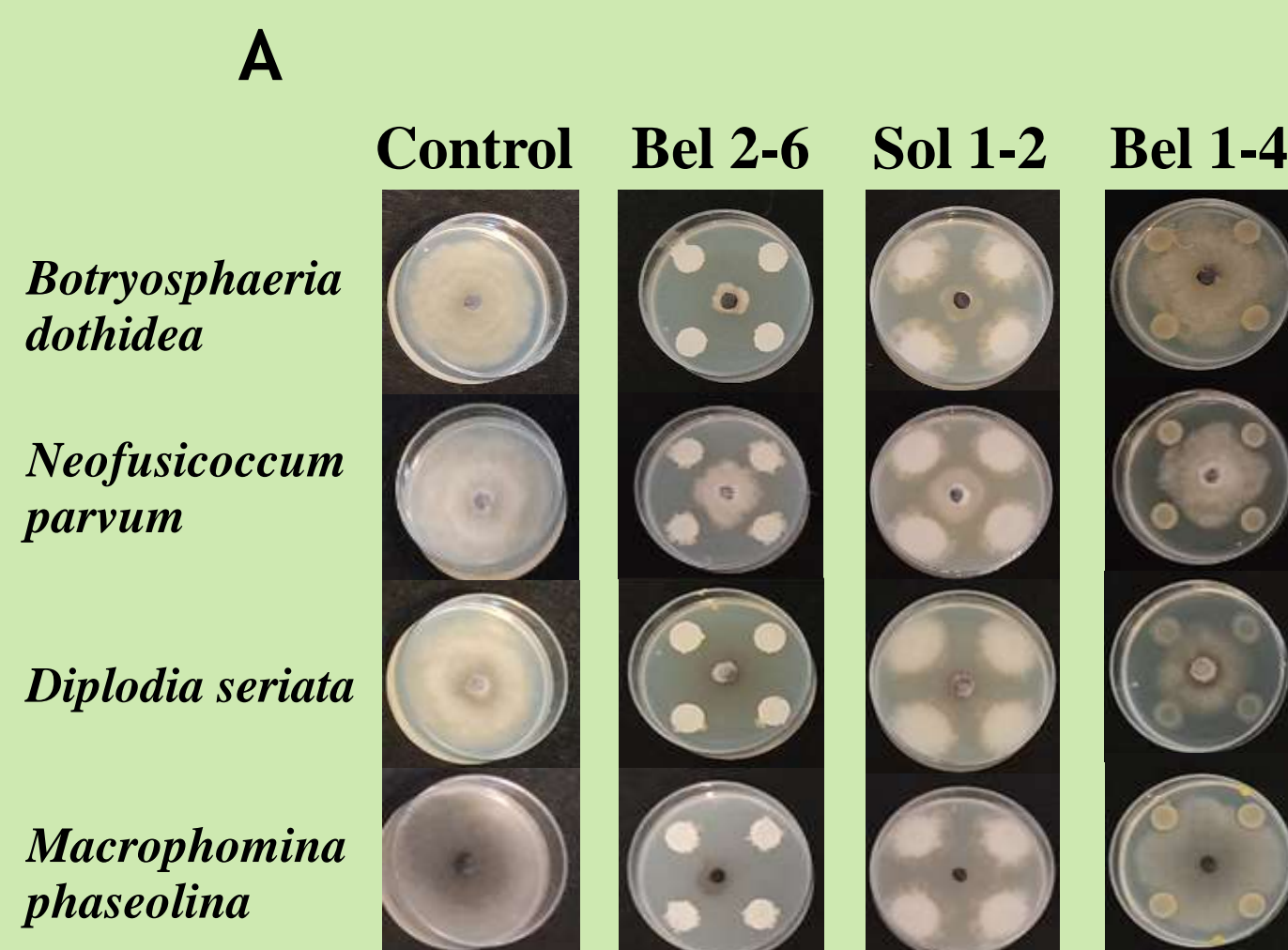
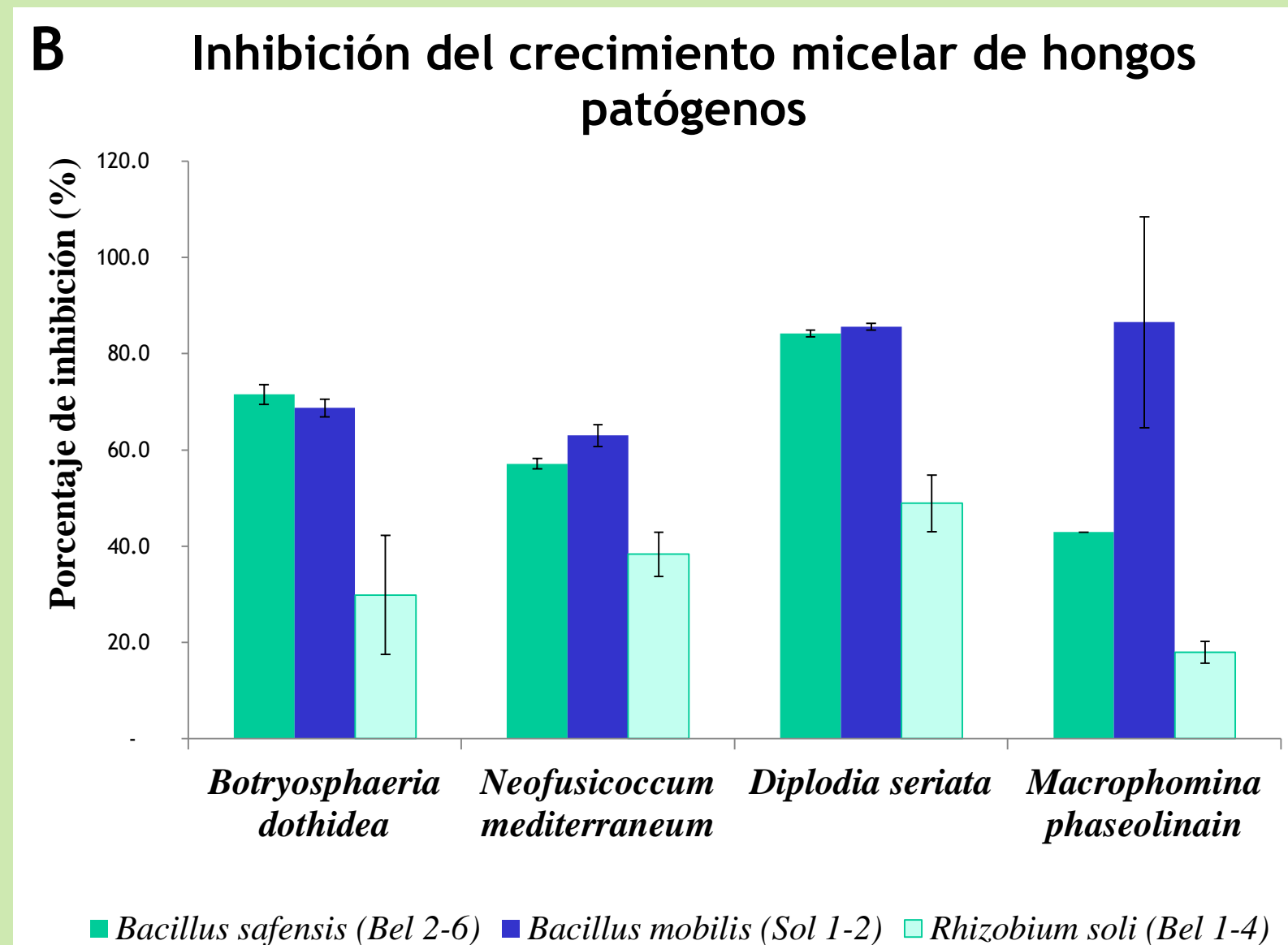


Fig. 3. A) Enfrentamientos duales *in vitro* de las 4 especies de hongos patógenos y 3 cepas bacterianas. De izquierda a derecha: hongo patógeno sin bacteria, hongo con *B. safensis* subsp. *safensis*, *Bacillus mobilis* y *Rhizobium soli*, respectivamente. B) Porcentaje de inhibición del crecimiento micelar de las 4 especies fúngicas por parte de las tres cepas bacterianas



❖ **Enfrentamientos *in planta***: La cepa AC17 de *Pseudomonas aeruginosa* y AcH16 de *Bacillus velezensis* redujeron significativamente el tamaño de las lesiones provocadas por *B. dothidea* (Bd) y *N. parvum* (Np) (Fig. 4A y 4B)

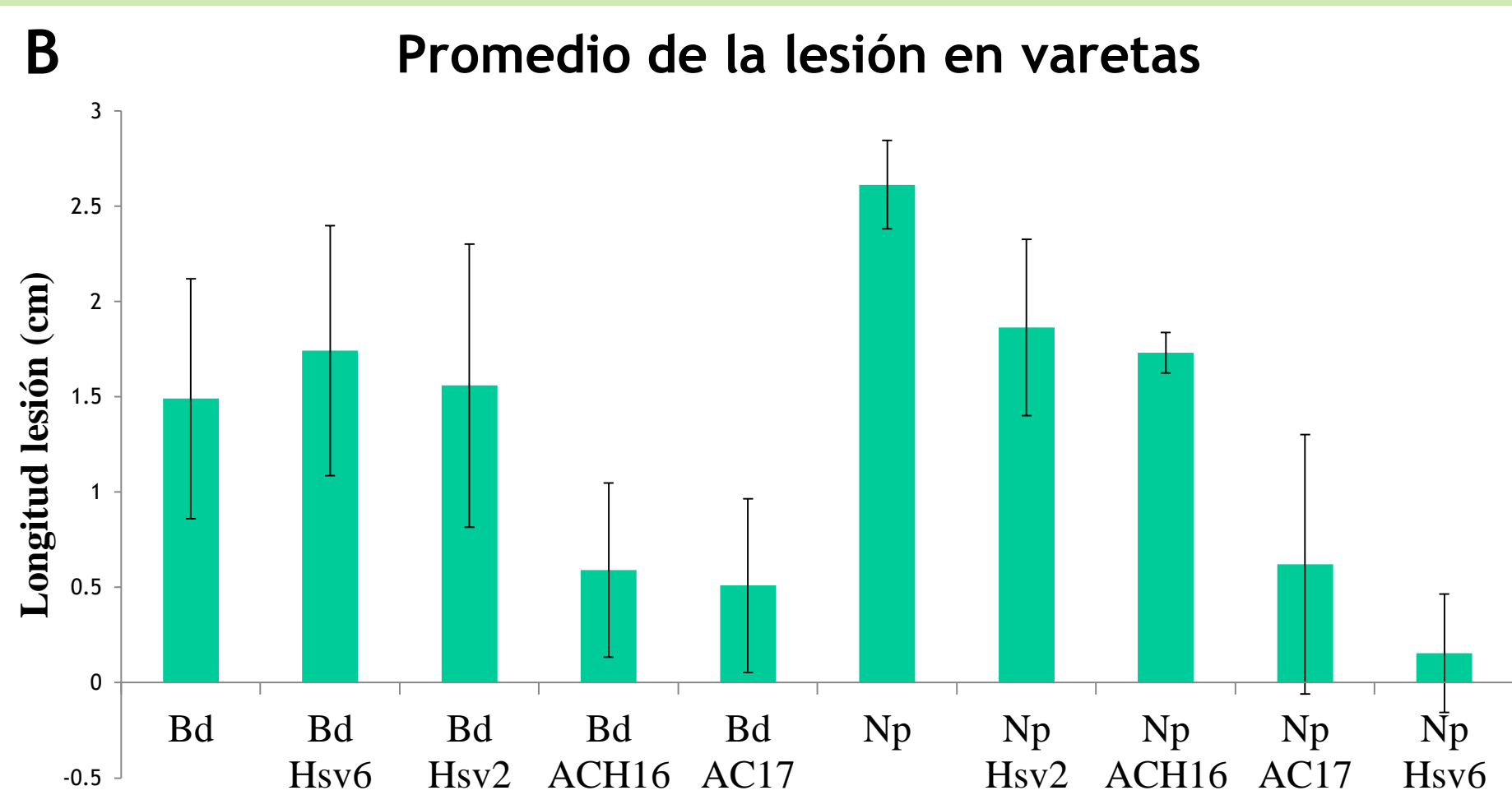
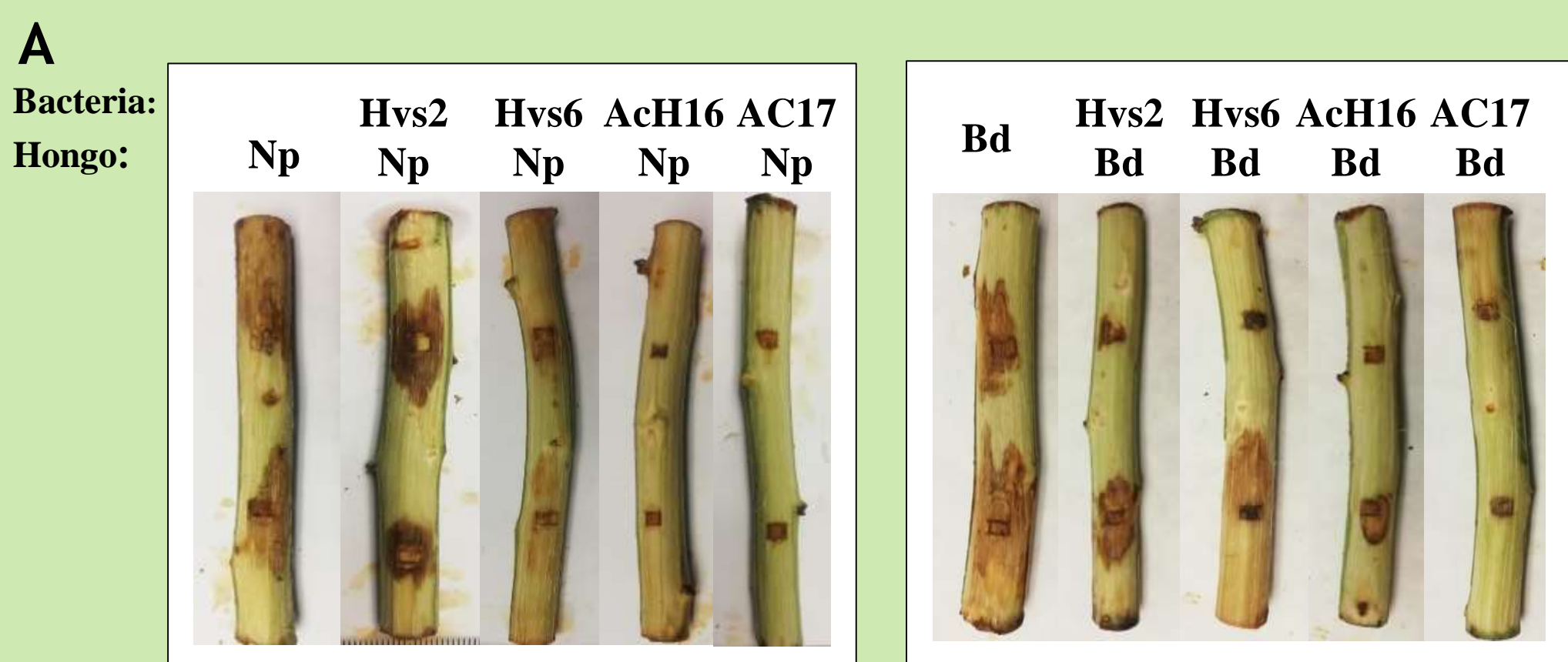


Fig. 4. A) Lesiones causadas en varetas escindidas de almendro inoculadas con los hongos Np y Bd (izquierda) y coinoculadas con los hongos y las cepas bacterianas rizosféricas *Bacillus paralicheniformis* (Hsv2), *Streptomyces fradiae* (Hsv6), *Bacillus velezensis* (AcH16) y *Pseudomonas aeruginosa*. B) Promedio de longitud de lesiones provocadas por las combinaciones hongo patógeno/bacteria potencial ACB

CONCLUSIONES

Las cepas Sol 1-2 de *Bacillus mobilis* y Bel 2-6 *B. safensis* subsp. *safensis* (endófitas de almendro) y AC17 de *Pseudomonas aeruginosa* y AcH16 *Bacillus velezensis* (rizosféricas) son potenciales agentes de control biológico de hongos de almendro de la familia *Botryosphaeriaceae*, causantes de enfermedades de madera. La producción de enzimas hidrolíticas, podría estar relacionada con el mecanismo de acción de estos potenciales agentes de control biológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Gramaje, D. *et al.* (2012). Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia*, 28, 1–13. <https://doi.org/10.3767/0011285120020155>
- Michailides, T. *et al.* (2006). Chemical and cultural control of band canker of almond caused by *Botryosphaeria dothidea*. Pages 157-165, In: Proceedings of Almond Board. Almond Board of California, Modesto.
- Latorre, B.A. *et al.* (2013). Evaluation of the use of wound-protectant fungicides and biological control agents against stem canker (*Neofusicoccum parvum*) of blueberry. *Ciencia e investigación agraria*, 40, 547-557.