



Invernadero de Pointsettias.

Retos y oportunidades de los fitosanitarios biológicos en espacios verdes ornamentales

M^a Isabel Trillas

Facultat de Biologia.
Secció Fisiologia
Vegetal. Universitat de
Barcelona.

**Eva Casanova, Elena
Fernández y Guillem
Segarra**

Biocontrol
Technologies, S.L. *spin
off* de la Universitat de
Barcelona

En este artículo trataremos de una forma muy breve el procedimiento de registro fitosanitario de los productos para la protección de las plantas (PPP) biológico o químico en Europa, siguiendo la Regulación EC 1107/2009, desde la autorización de la sustancia activa y después de las autorizaciones de eficacia del producto formulado en los distintos Estados miembros.

Se hace énfasis en la inocuidad para la salud y el medio ambiente de los PPP biológicos y la falta de autorizaciones/ implementación de estos productos para cultivos ornamentales y forestales, comparado con cultivos hortícolas. Expondremos nuestra experiencia en las autorizaciones para especies ornamentales en Europa, mostraremos estudios de eficacia en semilleros de planta ornamental, forestal. Todo, analizando la problemática de cultivos de usos menores en los distintos Estados miembros, así como la consideración regulatoria de producto biológico de 'bajo riesgo' en la implementación del control biológico para las enfermedades de las plantas en general y de forma específica de ornamentales, en vivero/cultivo y su uso en espacio privado y público.

El proceso de Registro de productos para la protección de las plantas en Europa

El procedimiento del Registro fitosanitario de todo Producto para la Protección de las Plantas (PPP) biológico o químico en Europa debe seguir el Reglamento (CE) 1107/2009 que de forma muy sintética consta de dos fases: la entrega de la documentación técnica pertinente para la evaluación de una sustancia activa (SA) y seguidamente la evaluación del o de los productos formulados (PF). Así se preparan los estudios requeridos sobre el producto que se desea comercializar y se elige un país europeo para que los evalúe. En primer lugar, el país repórter evalúa la documentación entregada y genera un informe que envía a la EFSA (European Food Safety Authority), que lo revisa y prepara las conclusiones de la SA que va a autorizar y es la Comisión Europea quien publicará su decisión en el Boletín Oficial de la Unión Europea. Con la SA aprobada, se pasa a la segunda fase y aquí intervienen las autoridades nacionales que evalúan las eficacias. En nuestro caso, con la autorización N° 1238/2012 de la SA, se evaluó el PF a través de lo que se denomina “una evaluación zonal”, donde un país asume el papel de evaluador general, con la participación de los demás Estados implicados en la zona (conjunto de países con interés por comercializar el producto).

Los estudios que conforman la documentación técnica para la evaluación de la SA incluyen la clasificación y caracterización de la SA (moléculas químicas o microorganismos, como fue nuestro caso), estudios fisicoquímicos, de estabilidad del producto formulado, fitotoxicidad, mecanismos de acción, estudios de metabolitos/residuos, riesgos de exposición al operador, estudios toxicológicos y ecotoxicológicos, y también estudios preliminares de eficacia. Los estudios toxicológicos se realizan en ratas, conejos y cobayas y se evalúa el efecto de la SA/PF (ingestión, inhalación oral, toxicidad e irritación dérmica, irritación ocular, sensibilización). La metodología de los estudios de sensibilización no está validada para productos biológicos y, como medida de precau-

Tabla 1. Sustancias activas autorizadas en Europa como Productos para la Protección de las Plantas (PPP), según el Reglamento (CE) 1107/2009

STRAINS	COMMERCIAL NAME	ORGANISM	APPROVED	STRAIN	ACTION	DISEASE	CROPS
1	PRESTOP	FUNGI	<i>Clonostachys rosea</i> (<i>Glyocladium catenulatum</i>)	J1446	FU	<i>B. cinerea</i> <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>div diseases</i>	Vegetables, fruits wheat, corn pot, cut flowers, cuttings, bulbs
1	PBP-01001-I	FUNGI	<i>Paeclomyces lilacinus</i>	251	NE	<i>Pratylenchus</i> , <i>Globodera</i> <i>Meloidogyne</i>	potato tomato, tobacco, cucurbits, carrots, grape, ornamentals
3	Rotstop	FUNGI	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	VRA 1835 / 1984 FOC PG 410.3 Task force	FU	<i>Heterobasidium spp.</i>	Pinus, Picea, Larch
1	Proradix	BACTERIA	<i>Pseudomonas spp.</i>	DSMZ 13134	FU	soil born fungi	seed potatoes flowers (chrysanth. roses, gerberas etc). tomato, cucumber, eggplant, lettuces,
1	Mycostop	FUNGI	<i>Streptomyces (S. griseoviridis)</i>	K61	FU	seed - soil born dis <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , ..	fruits and vegetables leaf veget fresh herbs ornamentals, cut flowers ornamental cuttings bulbs, brassica veg
1	Actinovate	FUNGI	<i>Streptomyces lydicus</i>	WYEC 108	FU/BA	seed -soil born dis	vegetables, seed coating (spinach, cotton, tomato, cucumber, ornamentals) cut flowers, bulbs, pot plants
1	T34 Biocontrol	FUNGI	<i>Trichoderma asperellum</i>	T34	FU	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Pythium</i> <i>aphanidermatum</i>	carnation Solanac. Cucurbits
1	Dutch trig	FUNGI	<i>Verticillium albo-atrum</i> (<i>V. dahliae</i>)	WCS850	FU	<i>Ophiostoma novo ulmii</i>	Elm trees

ción y según los países evaluadores, se propone añadir en la etiqueta una frase de precaución, i/o H317. En concreto, la frase de precaución es “los microorganismos, pueden causar reacciones de sensibilización” o llevar en la etiqueta H (del inglés *hazardous* o peligroso), H317, como producto que puede provocar una reacción alérgica en la piel o sensibilización cutánea de categoría 1. Los estudios ecotoxicológicos se realizan evaluando la SA en algas, plantas acuáticas, plancton, peces, gusano de suelo, abejas, etc. Los PPP biológicos, por tanto, deben de superar “con éxito” todos estos estudios. Como los microorganismos son potencialmente productores de diversos metabolitos y toxinas, es muy importante para las autoridades evaluadoras de la solicitud de registro la demostración, a nivel de cepa, que no representa ningún riesgo potencial para la salud humana ni ambiental. El conjunto de estos estudios es muy importante y te ofrecen una gran confianza y seguridad sobre los riesgos en la salud humana/animal y el medio ambiente. Nuestro producto, posteriormente al registro y a partir de los estudios aportados, fue considerado por la Comisión Europea (2015) producto residuo cero, lo que implica, entre otras cosas, que no requiere de plazo de seguridad precosecha.

Autorizaciones de Productos para la Protección de las Plantas

Si bien durante la Directiva 91/414/CEE se retiraron del mercado el 74% de las sustancias activas autorizadas como productos PPP (mayoritariamente químicas), con el actual Reglamento (CE) 1107/2009 (reemplaza la anterior), el número total de sustancias autorizadas es próximo a quinientos, y de ellas 48 productos son microorganismos, lo que representa cerca del 10% (algunos de ellos basados en una sola cepa, otros con varias); en total, el número de cepas de microorganismos son 65.

De estos 48 productos, 26 son contra enfermedades ocasionadas por hongos y bacterias, tres contra nematodos, tres contra virus y dieciséis contra plagas. De las 32 contra enfermedades, mayoritariamente son para cultivos hortícolas y sólo dos son específicos de ornamentales/forestales y ocho están autorizados para hortícolas y ornamentales/forestales (Tabla 1). Según la base de datos de sustancias activas de la Comisión Europea¹ (consultada en agosto 2020).

¹ <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=active-substance.selection&language=EN>

De los dos productos específicos, uno de ellos consta de diversas cepas (VRA 1835/ 1984 / FOC PG 410.3), solas o combinadas, de *Phlebiopsis gigantea*, contra *Heterobasidion* sp. (enfermedad importante de las coníferas), y el segundo (*Verticillium albo-atrum*, cepa WCS850 FU) está autorizado contra la enfermedad holandesa del olmo (*Ophiostoma novo ulmis*). En este momento, según datos de la página web de la Comisión Europea, se están evaluando quince nuevos productos biológicos: cinco hongos, cinco bacterias y cinco virus.

En España (Tabla 2) hay 6 PPP biológicos (basados en *Trichoderma* spp.) y autorizados para plantas ornamentales – forestales; según la información obtenida en la página del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación² (consultada en setiembre 2020). La distinta numeración corresponde a que las primeras no fueron autorizadas bajo principios uniformes y las segundas sí, pero todas ellas son SA autorizadas por la EFSA y la Comisión Europea.

Nuestra experiencia en el desarrollo de un PPP biológico

Con el aislamiento de la cepa T34 de *Trichoderma asperellum* en la Universidad de Barcelona (UB) y con el posterior desarrollo del producto, registro y comercialización por parte de la *spin-off* UB, Biocontrol Technologies, S.L. adjuntamos durante evaluación de la SA los resultados de los estudios de eficacia frente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, en plantas de clavel; tanto los llevados a cabo en la UB, como los estudios (doce) realizados por las empresas con acreditación para Registro. T34 es una cepa que fue seleccionada contra *Fusarium oxysporum* (Cotxarrera y col., 2002) en el marco de una tesis doctoral y hay diversos estudios en publicaciones científicas internacionales que demuestran su eficacia frente al mismo patógeno en distintos cultivos hortícolas, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Cotxarrera y col., 2002, Segarra y col., 2010; Borrero y col., 2011), y también en ornamentales, *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* en clavel (Sant y col. 2010), en forestales en vivero, *Fusarium circinatum* en *Pinus radiata* (López-López y col., 2016).

Tabla 2. Sustancias activas autorizadas en España basados en *Trichoderma* spp. como Productos para la Protección de las Plantas (PPP), para ornamentales.

No. Registro	Nombre comercial	STRAINS	<i>Trichoderma</i> spp.	ENFERMEDAD	CULTIVOS
25924	Remedier	ICC012 ICC080	<i>T. asperellum</i> <i>T. gamsii</i>	<i>Armillaria</i> <i>Sclerotinia</i> , <i>Verticillium</i>	coníferas ornamentales herbáceas
24244	Tusal	T25 T11	<i>T. asperellum</i> <i>T. atroviride</i>	<i>Phytophthora</i> , <i>Fusarium</i> <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Pythium</i>	ornamentales herbáceas
25889	Triatum P	T22	<i>T. harzianum</i>	<i>Pythium</i>	ornamentales de flor ornamentales herbáceas ornamentales leñosas
25933	Xedavir	TV-1	<i>T. asperellum</i>	hongos suelo	arbustos y pequeños árboles ornamentales, ornamentales herbáceas
ES- 00283	T34 Biocontrol	T34	<i>T. asperellum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	clavel
ES- 01152	Tri-soil	I1237	<i>T. atroviride</i>	<i>Fusarium</i> spp.	arbustos y pequeños árboles ornamentales, ornamentales herbáceas

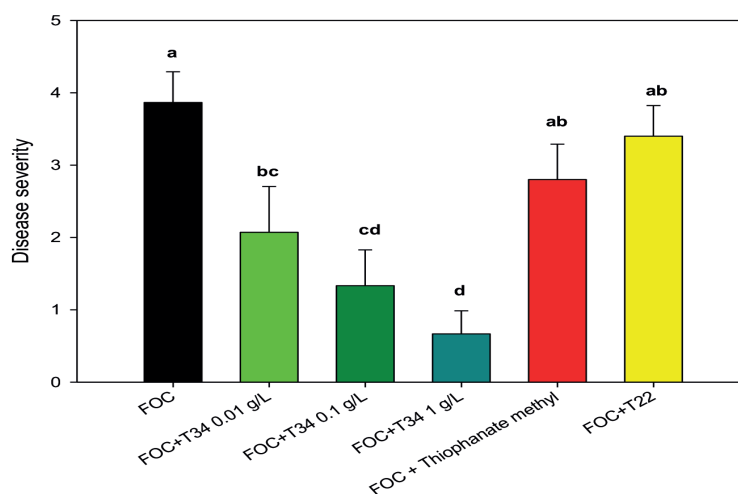


Figura 1. Niveles de enfermedad causados por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* (FOC) en plantas de *Cyclamen persicum* cv. Halios Curly F1 Mix. La enfermedad se evaluó por área necrótica del cormo, con una escala de severidad, donde 0= planta sana, 1= 1% - 20% de enfermedad, 2= 21% - 40%, 3= 41% - 60%, 4= 61% - 80% y 5= 81-100% enfermedad (planta muerta). Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en un test LSD.

Para obtener las autorizaciones para otras especies ornamentales o forestales se requieren de nuevos estudios, algunas especies vegetales son extrapolables y requieren de un menor número, pero hay una gran diversidad de familias y especies de cultivos ornamentales/forestales y es muy difícil poder hacer frente a los costos en tiempo y dinero para todas ellas. Sólo pueden acometerse para productos de alto valor/hortícolas, con importantes superficies de cultivo. Bajo nuestro punto de vista, este es uno de los motivos que ha llevado a que sean

más escasas las autorizaciones de productos biológicos para cultivos ornamentales, extensible a su autorización en espacios verdes.

Algunos de los diversos estudios efectuados con *T. asperellum*, cepa T34 para evaluar su comportamiento frente a especies ornamentales/forestales se muestran en las Figuras 1 y 2. En la Figura 1 se observan los resultados obtenidos con *Cyclamen* (*Cyclamen*

² <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/productos/consusact.asp>

persicum cv. Halios Curly F1 Mix) 36 días después del trasplante. El sustrato utilizado en este estudio fue turba, las macetas tenían un volumen de 400 ml y se utilizaron quince macetas (1 planta/maceta) por tratamiento. El patógeno, una cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (FOC) que se obtuvo del INRA de Dijon (Francia) y se inoculó a una concentración de 10^4 ufc/ml de sustrato en los seis tratamientos. Se estudiaron tres dosis de aplicación de T34 (la concentración del producto es de 1×10^9 ufc/ml), en la inmersión del cormo durante una hora antes del trasplante y las concentraciones que se evaluaron fueron: 0.01g/L agua, 0.1 g/L agua y 1 g/L agua. Después del trasplante y a los 17 días, en cada una de las tres dosis ensayadas se aplicaron 5 mg/L sustrato (riego).

La eficacia de T34 se comparó con un plaguicida químico standard (metil tiofanato) y con un standard biológico (*T. harzianum*, T22); las dosis y formas de aplicación de los tratamientos fueron de acuerdo con las instrucciones de las etiquetas. Metil tiofanato se aplicó después del trasplante riego de 0.75 g/L de solución (26,6 ml /maceta) y T22 (la concentración del producto es 1×10^7 ufc/g peso seco), inmersión del cormo durante una hora antes del trasplante a la concentración de 60g/L y después del trasplante 0.4 g/L solución y 26,6 ml /maceta. Las tres dosis evaluadas con *T. asperellum* T34 tuvieron significativamente menor enfermedad que las plantas sin tratar, pero inoculadas con el patógeno (-FOC). Las plantas tratadas con los dos productos standard (metil tiofanato o T22) redujeron la enfermedad, pero no fueron significativamente distintos que las plantas en las que no se hizo ningún tratamiento (FOC). El mejor resultado de T34 se obtuvo con la dosis más elevada aplicada en el baño del cormo (FOC+T34 1 g/L).

En la Figura 2 se presentan parte de los resultados descritos en la publicación de López-López y col. (2016). Se estudió el efecto protector del agente de control *T. asperellum* cepa T34 en la mortalidad producida por *Fusarium circinatum* en plantel de *P. radiata* cultivado en cinco tipos de sustratos a base de compost que presentaban un rango variable de supresividad natural frente al patógeno. En promedio

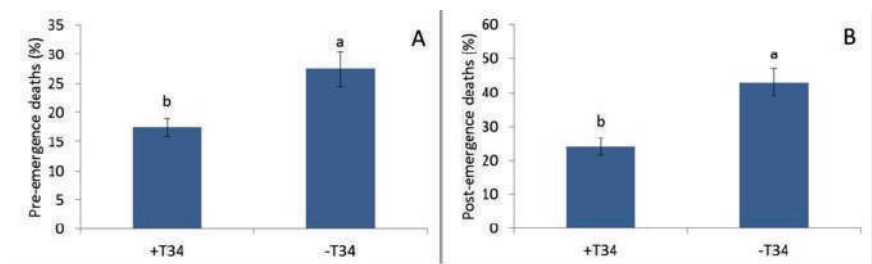


Figura 2. Incidencia de la enfermedad expresada como porcentaje de plantas muertas en el estadio de pre-emergencia (A) y post-emergencia (B) en plantel de *Pinus radiata* Don. *Trichoderma asperellum* cepa T34 fue inoculado a 10^4 conidias por ml de sustrato. *Fusarium circinatum* se inoculó con 10^3 microconidias por ml de sustrato. Las barras representan el valor promedio de los cinco sustratos evaluados con su respectivo error estándar. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en un test LSD.

se observó una reducción significativa del 36% del porcentaje de muertes en preemergencia y también de un 44% en postemergencia (Figura 2). En el caso de los sustratos conductores o poco supresores, la reducción de la enfermedad llegó al 50%.

A partir de la autorización de la SA (Regulación (EC) 1107/2009 por parte de la Comisión Europea (Tabla 1) N° 1238/2012 (*Official Journal of the European Union*, 20.12.2012, L350/59), en España se obtuvo la autorización (ES 00283) para el producto T34 Biocontrol® y, por lo que hace referencia a plantas ornamentales, es específica de clavel (Tabla 2). No obstante, con la misma documentación entregada (evaluación zonal, país reporter Reino Unido), en Francia tenemos una autorización (AMM 2160492) más amplia: plantas ornamentales en invernadero. También en Bélgica, la autorización (10481P/B) que se obtuvo fue la de cultivos anuales ornamentales en invernadero. Los países que incluían la evaluación zonal eran Reino Unido, Bélgica, España, Francia, Holanda, Italia, Irlanda y Portugal. Por tanto, hay países que su interpretación es más amplia, y en otros, específicas y ajustadas a la documentación aportada.

Hay algunas medidas que permiten tener autorizaciones para los PPP de una forma más rápida y con menos estudios; esto sería a través de lo que se conoce como 'cultivos menores'. En este sentido, tanto en el Reino Unido, con la autorización MAPP 17290 y extensión de autorización N° 1810 de 2016, como en Irlanda, con la autorización PCS N° 05620, tenemos una autorización de comercialización amplia: cultivos ornamentales y semilleros forestales, de nuevo con la misma documentación aportada.

En realidad, en casi todos los países europeos los cultivos ornamentales se consideran cultivos de usos menores. La excepción, evidentemente por superficie de cultivo, es Holanda, donde se consideran cultivos de importancia o 'cultivos mayores'. En España, cuando se ha preguntado por la documentación y requisitos para preparar/entregar una solicitud para usos menores de ornamentales, la información que hemos obtenido por parte de las autoridades de Registro es que las especies ornamentales no se encuentran en la lista de cultivos menores.

Perspectivas de futuro para la especies ornamentales y forestales

Bajo nuestro punto de vista, experiencia adquirida en la universidad y también en la *spin-off*, hemos observado ciertas incongruencias en las autorizaciones, como las indicadas anteriormente y también por las interpretaciones en los distintos Estados de la Unión Europea en lo que hace referencia al etiquetaje de estos productos biológicos. En el caso de T34 Biocontrol®, por lo que hace referencia a H317, las interpretaciones de los distintos Estados, y en concreto con el mismo registro zonal, en Holanda, Bélgica y Francia, fueron distintas al resto de países; así, en estos tres países, en la etiqueta de T34 Biocontrol® no hay la clasificación de peligro H317 y sólo la frase de seguridad, mientras que en los demás Estados, sí.

En conclusión, y según nuestra experiencia respecto las autorizaciones en Europa para todo el complejo de plantas ornamentales/forestales, es necesaria una buena descripción por

Alternativas sostenibles de control de los Espacios Verdes

países de cuáles son considerados cultivos menores, una mejor armonización de criterios en las autorizaciones y la equiparación de etiquetaje con la eliminación de la etiqueta H317. Todo ello, acompañado de que todos/algunos productos biológicos serán considerados de bajo riesgo, lo que conllevará una disminución en el número de ensayos de eficacia requeridos, reduciendo el coste de registro que representará una ampliación en el número de usos (ornamentales y

hortícolas) autorizados de los PPP biológicos. Por ejemplo, las últimas cepas de *Trichoderma* spp. autorizadas han sido consideradas de *low risk*. Por nuestra parte, y con la renovación del registro de la sustancia activa de T34 Biocontrol®, se espera que *Trichoderma asperellum*, cepa T34 sea considerada SA de bajo riesgo.

Por todo lo que acabamos de indicar, debemos ser optimistas con los nuevos productos biológicos en eva-

luación que vayan sustituyendo a los productos químicos de mayor riesgo. Todo ello llevará a que en un próximo futuro haya una implementación progresiva de los PPP biológicos en el control de las enfermedades, dentro del control integrado de plagas y enfermedades de las plantas, que beneficiará su uso en semilleros y cultivo de plantas ornamentales y forestales, y también se traducirá en su aplicación en espacios privados y verdes urbanos.

Bibliografía

- ! Borrero, C., Trillas, M.I., Delgado, A., Avilés, M. 2011. Effect of ammonium nitrate ratio in nutrient solution on control of Fusarium wilt of tomato by *Trichoderma asperellum* T34. *Plant Pathology* 61: 132-139.
- Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M.I., Steinberg, C., Alabouvette, C. 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress Fusarium wilt of tomato. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 467-476.
- López-López, N., Segarra, G., Vergara, O., López-Fabal, A., Trillas, M.I. 2016. Compost from forest cleaning Green waste and *Trichoderma asperellum* strain T34 reduced incidence of *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control* 95: 31-39.
- Sant, D., Casanova, E., Segarra, G., Avilés, M., Reis, M., Trillas, M.I. 2010. Effect of *Trichoderma asperellum*, strain T34 on Fusarium wilt and water usage in Carnation grown on compost-based growth medium. *Biological Control* 53: 291-296.
- Segarra, G., Casanova, E., Avilés, M., Trillas, M.I. 2010. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial Ecology* 59: 141-149.



STARSKii

AMBLYSEIUS SWIRSKii

La única amenaza es para las plagas.

Protege tus cultivos con la nueva tecnología de Bioline.



 **Bioline**
Iberia

TECNOLOGÍA QUE PROTEGE

www.biolineagrosociencias.com