

ANTAGONISMO DE CEPAS DE *Pseudomonas fluorescens* Y *Burkholderia cepacia* CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS DEL ARROZ Y EL MAÍZ

I. Trujillo, Acela Díaz, Annia Hernández y Mayra Heydrich

Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Calle 25, #455, e/I y J. Plaza. Código Postal 10400.
Ciudad de La Habana, Cuba. Correos electrónicos: *acela@fbio.uh.cu*, *mayra@fbio.uh.cu*

RESUMEN: Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) influyen de forma directa o indirecta en el desarrollo de los cultivos. Este trabajo tiene como objetivos determinar la actividad antagónica y el efecto inhibitorio de los metabolitos activos producidos por rizobacterias ante fitopatógenos que afectan a los cultivos del maíz y el arroz. Para ello se desarrollaron bioensayos *in vitro* en el medio King B. Se utilizaron cepas de referencia y autóctonas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia*, previamente aisladas de la rizosfera del maíz variedad Francisco mejorado, para determinar sus potencialidades como antagonistas de los patógenos fúngicos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Curvularia* sp. y *Fusarium* sp. Los resultados mostraron que las rizobacterias estudiadas tienen actividad antagónica y sus metabolitos efecto inhibitorio ante los hongos fitopatógenos enfrentados, destacándose con el mejor comportamiento las cepas de *P. fluorescens* MPf2, MPf3, J-143 y *B. cepacia* MPP8. Se observó un mayor efecto de las rizobacterias frente *Curvularia* sp. y *A. alternata*. Estos resultados poseen valor práctico, pues se selecciona un conjunto de cepas potencialmente eficientes en el control biológico de patógenos que podrían ser utilizadas en la agricultura en beneficio de los cultivos del arroz y el maíz.

(Palabras clave: *Pseudomonas fluorescens*; *Burkholderia cepacia*; antagonistas; fitopatógenos)

ANTAGONIST ACTIVITY OF *Pseudomonas fluorescens* AND *Burkholderia cepacia* STRAINS AGAINST RICE AND MAIZE PHYTOPATHOGENIC FUNGI

ABSTRACT: Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) has been proved to exert a beneficial effect on crop yield, directly or indirectly. This work was aimed to determine the antagonistic activity and inhibitory effect exerted on different plant pathogens by rhizobacteria. A number of bioassays was carried *in vitro* in King B medium. Previously isolated bacterial strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia cepacia*, from corn plants var. Francisco mejorado, were assayed to determine their potential as antagonists of the phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Curvularia* sp. and *Fusarium* sp. The results showed the capability of inhibiting the pathogen growth by the rhizobacterial strains, proving the best behaviour the strains *P. fluorescens* MPf2, MPf3, J-143 and *B. cepacia* MPP8. It was shown that there was a greater inhibitory effect on the fungi strains *Curvularia* sp. A1 and *A. alternata* M2. Considering these results, the bacterial strains were competent for pathogen biocontrol, and could be used in agriculture as valuable growth promoting agents in maize and rice crops.

(Key words: *Pseudomonas fluorescens*; *Burkholderia cepacia*; antagonists; phytopathogens)

INTRODUCCIÓN

La aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) es una alternativa viable tanto en países con una agricultura subdesarrollada, que carecen de fertilizantes, como en los que practican la

agricultura moderna, ya que permitiría reducir la cantidad de fertilizantes y plaguicidas químicos que contaminan el medio ambiente y deterioran el suelo, despojándolo de la materia orgánica y erosionándolo. Dentro de esta clasificación se agrupan múltiples géneros bacterianos, como *Pseudomonas*, *Bacillus*,

Azotobacter, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* y *Klebsiella* (9,18).

Las PGPB pueden promover el crecimiento por vías directas o indirectas, cuyos elementos específicos no han sido debidamente caracterizados. Los efectos directos pueden evidenciarse en ausencia de otros microorganismos, es decir, la planta solo interactúa con el microorganismo en estudio; mientras que los mecanismos indirectos se pueden observar en la interacción del microorganismo de interés con un fitopatógeno, mediante la cual se reducen los efectos dañinos en el vegetal (10,15).

Entre los mecanismos de control biológico mediados por rizobacterias ampliamente reconocidos se encuentran: la competencia por un nicho ecológico o sustrato, la síntesis de compuestos inhibitorios como sideróforos, antibióticos, enzimas líticas y detoxificadoras (1), así como la inducción de resistencia sistémica en la planta (7,11).

Las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*, son de los grupos más estudiados porque tienen la capacidad de producir reguladores del crecimiento vegetal y otros metabolitos con efecto antagónico y represivo del crecimiento de patógenos en la rizosfera (6), por lo que resulta de gran importancia la caracterización y selección de cepas autóctonas de estos géneros, los cuales muestran efecto antagónico ante patógenos que atacan a cultivos de importancia económica, de forma tal que se puedan aprovechar sus potencialidades como agentes de control biológico.

En este sentido, el objetivo de este trabajo es determinar la actividad antagónica y el efecto inhibitorio de los metabolitos producidos por las cepas estudiadas ante hongos fitopatógenos de los cultivos del maíz y el arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos microbianos: Se utilizaron nueve cepas autóctonas de las especies *Pseudomonas fluorescens* (MPf2, MPf3, MPf4, MPf5, MPf6 y MPf19) y *Burkholderia cepacia* (MPp8, MPp16, MPp20), previamente aisladas de la rizosfera del cultivo del maíz variedad Francisco mejorado en el año 2002 (5). Como controles fueron utilizadas las cepas de referencia de *B. cepacia* 0057 y *P. fluorescens* J-143, pertenecientes a la Colección de Cultivos de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. Todas las cepas se encontraban conservadas en Caldo LB (DUCHEFA BIOCHEME) con glicerol al 40%, a -20°C.

Se utilizaron cepas de los hongos fitopatógenos *Curvularia* sp. A1, *Fusarium* sp. A2, *Fusarium*

oxysporum M1 y *Alternaria alternata* M2, todas gentilmente donadas por el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) y conservadas en tubos de cultivo con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) (DIFCO), a 4°C.

Determinación del efecto antagónico de las rizobacterias ante fitopatógenos de los cultivos del maíz y el arroz: Se desarrollaron bioensayos *in vitro* para determinar el efecto antagónico de las cepas bacterianas ante cepas de hongos fitopatógenos de los cultivos del arroz (*Curvularia* sp. A1, *Fusarium* sp. A2) y el maíz (*Fusarium oxysporum* M1, *Alternaria alternata* M2). En todos los casos se siguió la metodología descrita por Bashan *et al.* (3).

Para este estudio fue utilizado el medio King B, compuesto por: 8.7 mL de glicerol, 1.5 g de peptona, 1.5 g de K_2HPO_4 y 1.5 g de $MgSO_4$ (todo por L de H_2O mili Q), teniendo en cuenta resultados precedentes que demostraban que en este medio de cultivo ambos grupos microbianos mostraban un buen crecimiento (15) y que el mismo favorece la producción de metabolitos secundarios por parte de las bacterias utilizadas como antagonistas (12).

Para ello los hongos se sembraron previamente en el medio de cultivo seleccionado y se incubaron a $30^\circ C \pm 2^\circ C$ durante 7 días. Posteriormente, se realizaron perforaciones en las placas previamente sembradas con el hongo, en la parte central de la colonia, utilizando un obturador con diámetro de 5 mm. Los parches fueron colocados en el centro de las placas sembradas con la bacteria, utilizándose un parche para cada placa. Se sembraron ambos microorganismos al mismo tiempo y se realizó la incubación a $30^\circ C$ durante 7 días. El efecto antagónico de las bacterias fue determinado a través de mediciones del diámetro de crecimiento del hongo (mm) en comparación con un tratamiento control donde no se aplicó el antagonista bacteriano. Las placas Petri utilizadas tenían un diámetro de 90mm.

Determinación del efecto inhibitorio de metabolitos producidos por las rizobacterias ante fitopatógenos de los cultivos del maíz y el arroz: Para determinar el efecto inhibitorio de los metabolitos producidos por las cepas se realizaron bioensayos *in vitro* (3). Para ello primeramente las placas Petri con el medio de cultivo King B se sembraron con las diferentes cepas de rizobacterias por diseminación con espátula de Drigalsky y se incubaron durante 48 horas a $30^\circ C \pm 2^\circ C$ y $37^\circ C \pm 2^\circ C$, en dependencia de la especie bacteriana. Una vez crecidas las bacterias, las placas se sometieron a vapores de cloroformo durante 30 minutos (5). Posteriormente fueron cola-

dos discos de 5 mm de diámetro que contenían los hongos patógenos en el centro de las placas libres de células.

Los discos de hongos fueron previamente obtenidos como se describe en el acápite anterior. El porcentaje de inhibición se determinó a través del diámetro de crecimiento del hongo (mm) en comparación con el control.

En ambos casos se estableció un diseño Completamente Aleatorizado estableciéndose 10 réplicas por tratamiento. Los bioensayos fueron repetidos 3 veces cada uno.

Análisis biométricos: Como punto de partida a los porcentajes de inhibición se les realizó la prueba de normalidad de Shapiro y Wilk, haciendo uso de la versión simplificada (13), y la prueba de homogeneidad de varianza, a partir de las cuales se decidió realizar análisis no paramétricos.

Los datos fueron analizados utilizando la prueba no paramétrica de comparación múltiple de Kruskal Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de medias no paramétrica de Student-Newman-Keuls (SNK), con el paquete estadístico STATISTIC versión 6.0.

RESULTADOS

Efecto antagónico de las cepas bacterianas en estudio

Los resultados mostraron que las cepas de rizobacterias ejercen efecto antagónico ante los patógenos estudiados. Al establecerse la interacción entre los antagonistas bacterianos y las cepas de

Fusarium sp. A2 y *Curvularia* sp. A1 se observaron diferentes niveles en los porcentajes de inhibición.

Al enfrentar las rizobacterias a la cepa de *Fusarium* sp. A2, las cepas de *P. fluorescens* MPf3 y J-143 se destacaron por presentar los mayores porcentajes de inhibición, mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Fig. 1). Asimismo todas las cepas estudiadas mostraron efecto antagónico frente a la cepa de *Curvularia* sp. A1. En este caso, las cepas *P. fluorescens* MPf2, MPf3 y J-143 se destacaron por lograr una inhibición total del crecimiento del hongo, no mostrando diferencias significativas con la cepa MPp8 (Fig. 1).

Por otro lado, al analizar el efecto antagónico de las cepas bacterianas en estudio ante los hongos fitopatógenos *F. oxysporum* M1 y *A. alternata* M2, también se observaron altos porcentajes de inhibición del crecimiento.

Con relación a *F. oxysporum* M1, en la Figura 2 se muestra que las cepas que presentaron los mayores índices de inhibición fueron las de *P. fluorescens* J-143, MPf4, *B. cepacia* 0057 y MPp8.

Al interactuar las rizobacterias con *A. alternata* M2, se observaron altos índices de inhibición del crecimiento del hongo, al compararse los tratamientos con el control (Figura 2). Las cepas más destacadas fueron las de *P. fluorescens* MPf2, MPf6 y *B. cepacia* MPp8, mostrando porcentajes de inhibición superiores al 97%.

Efecto inhibitorio de los metabolitos producidos por las rizobacterias en estudio

Resultados similares a los anteriores fueron encontrados al enfrentar los metabolitos activos produ-

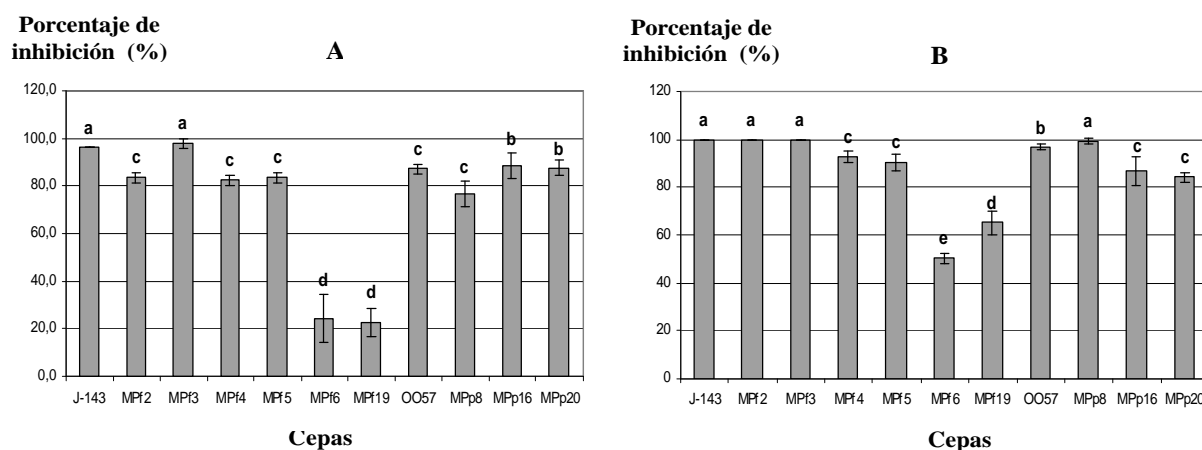
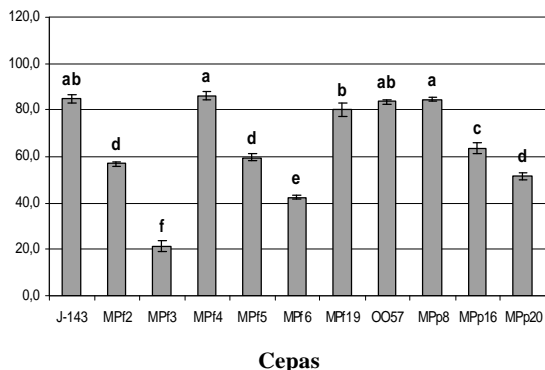


FIGURA 1. Porcentaje de inhibición de las rizobacterias ante los fitopatógenos del arroz: *Fusarium* sp. A2 (A) y *Curvularia* sp. A1 (B)./ *Percentage of growth inhibition of rhizobacteria against rice phytopathogens: Fusarium* sp. A2 (A) and *Curvularia* sp. A1 (B) caused by PGPB. Letras no comunes indican diferencias significativas entre los tratamientos para un SNK no paramétrico ($p < 0.05$).

Porcentaje de inhibición (%)



Porcentaje de inhibición (%)

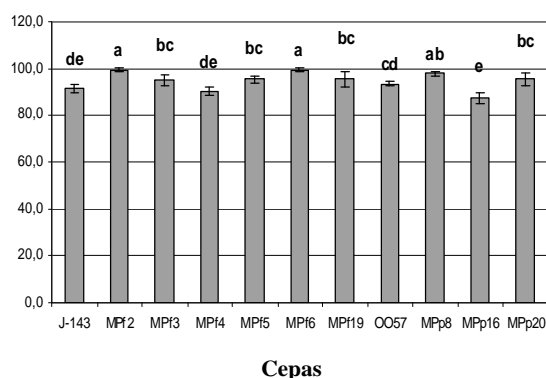
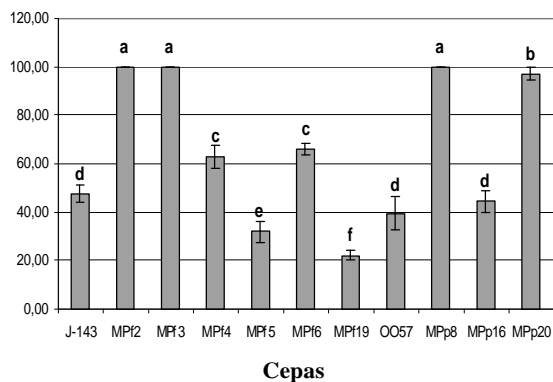


FIGURA 2. Porcentaje de inhibición de las rizobacterias ante los fitopatógenos del maíz: *Fusarium oxysporum* M1 (A) y *Alternaria alternata* M2 (B)./ *Percentage of growth inhibition of rhizobacteria against maize phytopathogens: Fusarium oxysporum* M1 (A) and *Alternaria alternata* M2 (B) caused by PGPB. Letras no comunes indican diferencias significativas entre los tratamientos para un SNK no paramétrico ($p < 0.05$).

Porcentaje de inhibición (%)



Porcentaje de inhibición (%)

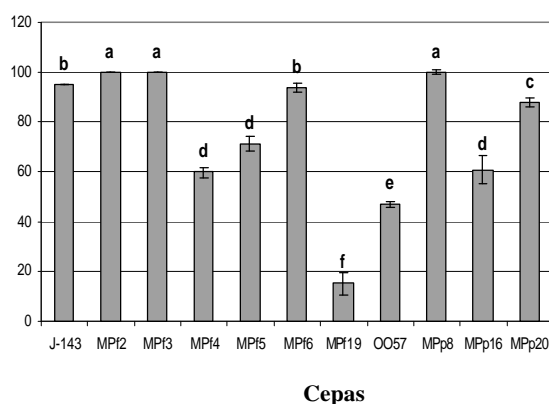


FIGURA 3. Porcentaje de inhibición de los metabolitos producidos por las rizobacterias ante los fitopatógenos del arroz *Fusarium* sp. A2 (A) y *Curvularia* sp. A1 (B)./ *Percentage of growth inhibition of rice phytopathogens: Fusarium* sp. A2 (A) and *Curvularia* sp. A1 (B) caused by metabolites produced by PGPB. Letras no comunes indican diferencias significativas entre los tratamientos para un SNK paramétrico ($p < 0.05$).

cidos por las rizobacterias a los hongos fitopatógenos en estudio, lo que indica el efecto inhibitorio de los mismos.

Los metabolitos producidos por las cepas MPf2, MPf3 y MPp8 lograron inhibir totalmente el crecimiento del hongo *Fusarium* sp. A2, mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Fig. 3). Los metabolitos que menor inhibición del crecimiento fúngico evidenciaron fueron los producidos por *P. fluorescens* MPf5 y MPf19, con diferencias significativas entre sí.

Los metabolitos producidos por las cepas bacterianas también inhibieron el crecimiento de

Curvularia sp. A1 (Figura 3), al igual que las cepas MPf2, MPf3 y MPp8 inhibieron un 100% del crecimiento del hongo. En este caso las cepas que menor efecto inhibitorio mostraron fueron las de *B. cepacia* OO57 y *P. fluorescens* MPf19.

Al enfrentar los metabolitos producidos por las rizobacterias a los hongos fitopatógenos *A. alternata* M2 y *F. oxysporum* M1 también observaron diferentes niveles de inhibición. Las cepas que mostraron mayores porcentajes de inhibición frente a *Fusarium oxysporum* M1 fueron MPf2, MPf3, MPp8 y MPp16.

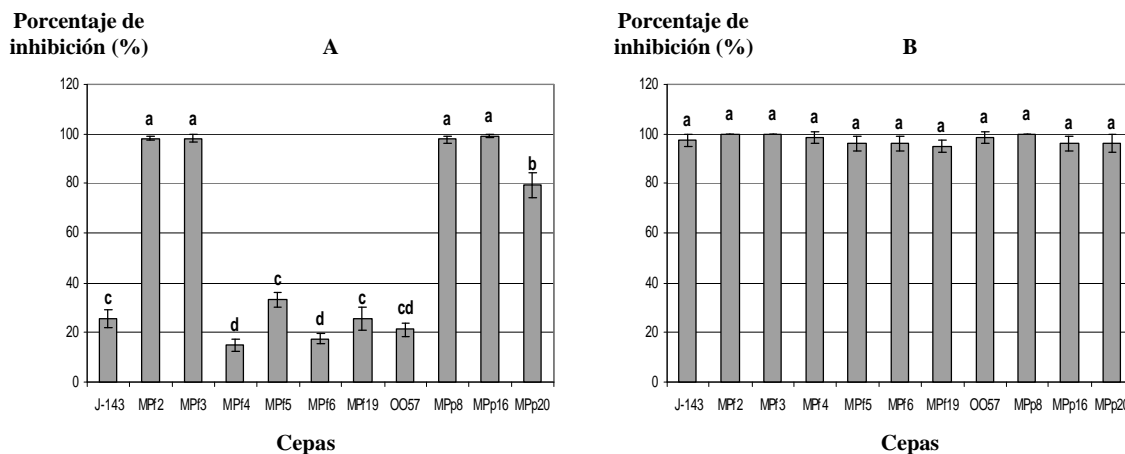


FIGURA 4. Porcentaje de inhibición de los metabolitos producidos por las rizobacterias ante los fitopatógenos del maíz: *Fusarium oxysporum* M1 (A) y *Alternaria alternata* M2 (B)./ *Percentage of growth inhibition of maize phytopathogens: Fusarium oxysporum* M1 (A) and *Alternaria alternata* M2 (B) caused by metabolites produced by PGPB. Letras no comunes indican diferencias significativas entre los tratamientos para un SNK paramétrico ($p < 0.05$).

Se mostró un alto nivel de inhibición al enfrentarse los metabolitos producidos por las cepas al fitopatógeno *A. alternata* M2 (Fig. 4). En todos los tratamientos se encontraron porcentajes de inhibición del crecimiento fúngico con valores superiores al 94%, sin diferencias significativas entre los tratamientos. De este modo se corrobora la sensibilidad del hongo ante los productos del metabolismo de las rizobacterias en estudio.

DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que las cepas de rizobacterias utilizadas tienen efecto antagónico e inhibitorio ante los hongos fitopatógenos *Curvularia* sp. A1, *Fusarium* sp. A2, *Fusarium oxysporum* M1 y *Alternaria alternata* M2, lo que corrobora resultados obtenidos por otros autores que han señalado el efecto de las bacterias asociadas a las plantas en el control biológico de patógenos (6, 19).

Las cepas de *P. fluorescens* y *B. cepacia* estudiadas y sus metabolitos activos ejercen efecto antagónico e inhibitorio ante los hongos *Fusarium* sp. A2, *Curvularia* sp. A1, *F. oxysporum* M1 y *A. alternata* M2, destacándose por el mejor comportamiento las cepas MPf2, MPf3, J-143 y MPp8.

Se observó un mayor efecto de las rizobacterias antagonistas estudiadas frente a los hongos fitopatógenos *Curvularia* sp. A1 y *A. alternata* M2.

Las respuestas obtenidas podrían estar relacionadas con la producción de metabolitos de naturaleza

antibiótica. De hecho, Velázquez *et al.* (17) demostraron que la cepa de *Burkholderia cepacia* 0057, utilizada en este estudio, producía alcaloides quinolisidínicos de naturaleza antibiótica. También se ha señalado la capacidad que tienen las cepas de *Pseudomonas* de suprimir patógenos presentes en la rizosfera, a través de la producción de 2,4 dimethylphloroglucinol y pirrolnitrina (16).

En este caso, también podrían haber influido los sideróforos, si se tiene en cuenta que el medio de cultivo utilizado para el desarrollo de los bioensayos posee bajo contenido de hierro, lo que favorece la producción de este tipo de metabolito. En este sentido, diferentes autores (6, 12), señalaron que cepas autóctonas cubanas pertenecientes a las especies en estudio al crecer en medios de cultivo con concentraciones limitadas de hierro, tales como el King B y el Sirope fructosa (Sp.), producían sideróforos a partir de las 10 horas de crecimiento de la bacteria.

Asimismo, se demostró que cepas de las especies *B. cepacia* y *P. fluorescens* producían diferentes tipos de sideróforos (2, 6, 8), los que podrían estar involucrados en el antagonismo microbiano y en la resistencia sistémica inducida (RSI) en diferentes sistemas planta-patógeno.

Nuestros resultados evidencian que los metabolitos activos de origen bacteriano desempeñan una función vital en las interacciones microbianas. Sin embargo, se ha señalado que los antagonistas microbianos no poseen un único modo de acción, y que no es fácil determinar con precisión los mecanis-

mos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los fitopatógenos (4, 14).

Estos resultados poseen valor práctico pues se evalúa un conjunto de cepas con efecto antagónico ante patógenos que afectan a los cultivos del arroz y el maíz, las que podrían ser utilizadas en la biotecnología agrícola con vistas a obtener biopreparados en beneficio de cultivos de interés económico, una vez que se estudie su efecto en interacción con la planta.

REFERENCIAS

1. Bais, H.P.; Park, S.W.; Weir, T.L.; Callaway, R.M. y Vivanco, J.M. (2004): How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* 9: 26-32.
2. Barelman, I.; Meyer, J.M.; Taraz, K. y Budzikiewicz, H. (1996): Cepaciachelin, a new catecholate siderophore from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Z. Naturforsch.* 51: 627-630.
3. Bashan, Y.; Holguín, G. y Ferrera, R. (1996): Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra.* 14(2): 159-192.
4. Fernández-Larrea, Orieta (2001): Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas.* (Costa Rica). 62: 96-100.
5. Hernández, Annia (2002): Obtención de un nuevo producto bacteriano a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays* L.). *Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas.* 97p.
6. Hernández, Annia; Rives, N.; Caballero, A.; Hernández, A.N. y Heydrich, M. (2004): Caracterización de rizobacterias asociados al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideroforos y ácido salicílico. *Rev. Col. Biotec.* 6(1): 6-13.
7. Matiru, V.N. y Dakora, F. (2004): Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African J. Biotech.* 3: 1-7.
8. Meyer, J.M.; Tràn Van, V.; Stinzi, A.; Berge, O. y Winkelmann, G. (1995): Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formally *Pseudomonas cepacia*). *BioMetals.* 8: 309-317.
9. Nelson, L.M. (2004): Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online. Crop Management, Plant Management Network.
10. Ping, L. y Boland, W. (2004): Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 9(6): 262-266.
11. Ryu, C.M.; Murphy, J.F.; Mysore, K.S. y Kloepper, J.W. (2004): Plant growth-promoting rhizobacterial systemically protect *Arabidopsis thaliana* against *Cucumber mosaic virus* by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *The Plant J.* 39: 381-392.
12. Sánchez, L.; Ortiz, S. y Hernández, A. (2004): Evaluation of two culture media for producing siderophore from *Burkholderia cepacia* through stirred-tank fermentation. *Rev. Protección Veg.* 19(2): 97-101.
13. Shapiro, S.S. y Francia, R.S. (1972): An approximate Analysis of Variance Test for Normality. *J. of the American Statistical Association.* 67: 215-216.
14. Trujillo, I.D.; Hernández, A.; Díaz, A. y Heydrich, M. (2005): Selección de cepas de *P. fluorescens* y *B. cepacia* para el biocontrol de patógenos asociados al cultivo del arroz. En: *III Encuentro Internacional del arroz.* La Habana. Cuba. ISBN 959-7164-91-4.
15. Unno, Y.; Okubo, K.; Wasaki, J.; Shinano, T. y Osaki, M. (2005): Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. *Env. Microb.* 7(3): 396-404.
16. Validov, S.; Mavrodi, O.; De La Fuente, L.; Boronin, A.; Weller, D.; Thomashow, L y Mavrodi, D. (2005): Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microb. Letters.* 242: 249-256.
17. Velázquez, M.; Hernández, A.; Heydrich, M. y Hernández, A.N. (1999): Estudio de la interacción maíz-*Burkholderia cepacia*. *Rev. Lat. de Microb.* 41: 17-23.
18. Vessey, J.K. (2003): Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 255: 571-586.
19. Zehnder, G.W.; Murphy, J. F.; Sikora, E.J. y Kloepper, J.W. (2001): Application of rhizobacteria for induced resistance. *Eur. J. of Plant Path.* 107(1): 39-50.

(Recibido 20-3-2006; Aceptado 14-9-2006)