

IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS AUTÓCTONOS DE PSEUDOMONAS FLUORESCENTES CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA ANTE *Curvularia* spp.

Annia Hernández-Rodríguez*, D. León-Plasencia*, Narovis Rives-Rodríguez**,
Acela Díaz-de la Osa*, M. Almaguer-Chávez*, Yanelis Acebo-Guerrero*

*Facultad de Biología. Universidad de la Habana. Calle 25 #455 e/J e I. Vedado, Ciudad de la Habana, Cuba. Correo electrónico: annia@fbio.uh.cu, acebo@fbio.uh.cu; **Instituto de Investigaciones de Granos. Km 16 ½, Autopista Novia del Mediodía, Bauta, La Habana, Cuba

RESUMEN: La identificación de rizobacterias con potencialidades para el control biológico y estimulación del crecimiento vegetal resulta de especial interés para el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) en Cuba. Este trabajo tiene como objetivo identificar aislamientos autóctonos de pseudomonas fluorescentes con actividad antagónica ante *Curvularia pallescens* y *Curvularia trifolii*. Los resultados demostraron que todos los aislamientos tienen efecto antagónico ante los aislamientos fúngicos probados, mostrando porcentajes de inhibición desde 49% hasta un 83%. Las cepas bacterianas fueron incluidas dentro de las especies *Pseudomonas putida* (14 de ellas) y *Pseudomonas fluorescens* (tres). De modo general, se demuestra las potencialidades de estas rizobacterias como agentes de control biológico de patógenos fúngicos en el cultivo del arroz.

(Palabras clave: PGPB; rizobacterias; pseudomonas; arroz)

IDENTIFICATION OF NATIVE ISOLATES OF FLUORESCENT PSEUDOMONAS WITH ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST *Curvularia* spp.

ABSTRACT: The identification of rhizobacteria with potential for the biocontrol and plant growth promotion is of great interest for the improvement of rice crop (*Oryza sativa* L.) in Cuba. This work was aimed at identifying native fluorescent pseudomonas isolates with antagonistic activity against *Curvularia pallescens* and *Curvularia trifolii*. The results showed that all the isolates selected had antagonistic effect against the fungal isolates tested, showing inhibition percentages ranging from 49% to 83%. They were classified as *Pseudomonas putida* (14 of them) and *Pseudomonas fluorescens* (three). In general, it suggests the potential of these rhizobacteria as biocontrol agents against fungal pathogens in rice crop.

(Key words: PGPB; rhizobacteria; pseudomonas; rice)

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una gramínea originaria del continente asiático, cultivada y consumida por los humanos desde hace más de 7000 años (1). Su producción y distribución se concentran principalmente en Asia, aunque no debe descartarse su consumo en el resto del mundo. En Cuba, el consumo de arroz per cápita asciende a 60 kg por persona anualmente (2).

En el cultivo del arroz, las enfermedades microbianas constituyen uno de los factores que inciden en la obtención de bajos rendimientos y manchado de los granos, destacándose las de origen fúngico por ser las de mayor frecuencia de aparición. La enfermedad conocida como «manchado del grano» del arroz o «pecky rice», causada por un complejo fúngico y bacteriano, se presenta en la mayor parte de las regiones productoras de arroz del mundo y en Cuba, *Curvularia* spp. es uno de los géneros involucrados en

su aparición. Entre las principales especies de *Curvularia* que provocan afectaciones a los granos de arroz en Cuba se encuentran *C. pallescens* (Boedijn) y *C. trifolii* (Kuffman)(3).

Esta enfermedad causa pigmentación y reducción de la germinación (3), por lo que afecta los componentes del rendimiento y la calidad de los granos (4). Se ha demostrado que las bajas temperaturas, las precipitaciones continuas y una humedad relativa elevada en el momento de la floración y durante la maduración del grano son factores que influyen en su desarrollo (5).

Como parte de la agricultura sostenible, se trata de controlar estos patógenos y lograr altos rendimientos del cultivo mediante una combinación adecuada de fertilizantes químicos y productos biológicos. En este sentido, la aplicación de inoculantes bacterianos como las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB) ha constituido una alternativa ecológica, que favorece la conservación del medio ambiente y el agroecosistema (6,7,8).

Diversos estudios han demostrado la eficacia del empleo de PGPB para controlar enfermedades en el cultivo del arroz (9,10,11,12,13). Las bacterias pertenecientes al grupo de las pseudomonas fluorescentes se encuentran entre las más utilizadas como antagonistas bacterianos porque tienen la capacidad de producir una amplia variedad de metabolitos con efecto antagónico ante patógenos en la rizosfera, y constituyen un excelente ejemplo de la combinación de múltiples mecanismos para ejercer un efectivo control biológico (14,15,16,17,18,19).

Las investigaciones que involucran cepas de rizobacterias autóctonas de los ecosistemas arroceros en estudio son de suma importancia, ya que se plantea que estas podrían tener una mayor eficiencia en el control biológico de patógenos presentes en las mismas condiciones naturales. Sin embargo, es importante seleccionar aislamientos utilizando como primer criterio de selección la actividad antagónica frente al patógeno de interés, para luego proceder a la identificación y caracterización de los más promisorios mediante el uso de la taxonomía polifásica. Este trabajo tiene como objetivo identificar aislamientos autóctonos de pseudomonas fluorescentes con actividad antagónica frente a *C. pallescens* y *C. trifolii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y clasificación de los aislamientos: Se seleccionaron 17 aislamientos de pseudomonas fluorescentes procedentes de la rizosfera de la varie-

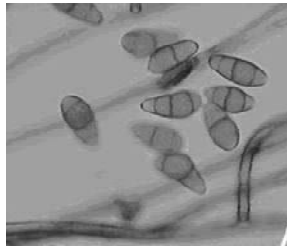

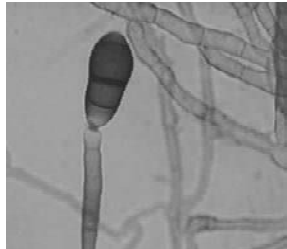
dad de arroz J-104 (20) sobre suelo Gley Vértico Crómico-Nodular Ferruginoso (12) y que habían mostrado actividad antagónica ante *Pyricularia grisea* (Sacc.). Los mismos se encontraban conservados en medio Luria Broth (LB) (8) con glicerol (1:1) a 4° C en la Colección de Cultivos del Departamento de Microbiología y Virología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. Se utilizaron además las cepas de referencia *Pseudomonas aeruginosa* (Migula) 7NSK2 y *Pseudomonas putida* (Trev.) WCS358 procedentes de la Colección de Cultivos de la Universidad de Gante en Bélgica, y la cepa *Pseudomonas fluorescens* (Migula) J-143 proveniente del Cepario Nacional de Biofertilizantes, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba. Para la identificación y clasificación de los aislamientos puros se realizaron determinaciones micromorfológicas y culturales en Medio King B (Merck), según lo informado por Bergey (21).

Actividad antagónica de los aislamientos frente a cepas de *Curvularia* spp.: Se realizó un bioensayo *in vitro* para determinar el efecto antagónico de los aislamientos bacterianos seleccionados frente a las tres cepas fúngicas: *C. pallescens* AAD 430, *C. pallescens* CH5 y *C. trifolii* AAD 533, previamente aisladas de un agroecosistema arrocerero perteneciente al Instituto de Investigaciones de Granos, Bauta, La Habana, Cuba (22) (cuyas características micromorfológicas se recogen en la Tabla 1 (23). Las cepas fúngicas se encontraban conservadas en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) (Biocen) a 4°C en la Colección de Cultivos Fúngicos de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana.

Para el desarrollo del experimento *in vitro* se siguió la metodología descrita por Hernández *et al.* (24). Se realizaron suspensiones bacterianas en solución salina fisiológica, ajustando la concentración celular a 10⁸ células. mL⁻¹, según la escala de McFarland. Se tomaron 100 µL de las suspensiones y se sembraron por diseminación en medio Agar King B. Los hongos se sembraron previamente en medio de cultivo King B (Merck) según lo informado por Trujillo *et al.* (26), y se incubaron a 30°C durante 7 días (25). Las placas Petri previamente sembradas con el hongo se perforaron utilizando un obturador de 5 mm de diámetro.

Los discos se colocaron en el centro de las placas Petri con medio King B sembradas con los aislamientos seleccionados, a razón de un disco para cada placa y cinco réplicas por tratamiento, luego se incubaron a 30°C durante 7 días. Se estableció un control donde no se aplicó el aislamiento bacteriano. La actividad antagónica de las bacterias se determinó a través de mediciones del diámetro de crecimiento del hongo

TABLA 1. Descripción de las principales características micromorfológicas de las cepas fúngicas seleccionadas./
Description of the main micromorphological characteristics of the selected fungal strains

Código	Especie	Principales características	Fotografía Aumento: 100x	Procedencia
AAD 430	<i>Curvularia pallescens</i>	Conidióforo geniculado, células conidiógenas cicatrizadas y conidios elipsoidales y fusiformes con células pálidas con presencia de 3 distoseptos		Muestreo aéreo
AAD 533	<i>Curvularia trifolii</i>	Célula conidiógena con una cicatriz asociada a un poro o conidios claviformes, obcónicos hacia la base, con 3 distoseptos y el hilo protuberante		Muestreo aéreo
CH 5	<i>Curvularia pallescens</i>	Conidióforo geniculado, células conidiógenas cicatrizadas y conidios elipsoidales y fusiformes con células pálidas con presencia de 3 distoseptos		Panículas infectadas

en presencia de las bacterias. Con estos datos se determinó el porcentaje de inhibición de los aislamientos sobre los fitopatógenos, según metodología descrita por Hernández *et al.* (24). El experimento se repitió cinco veces.

Identificación de los aislamientos: Se realizó mediante la utilización del sistema API 20NE (bioMérieux SA), un micrométodo estandarizado que combina 8 pruebas convencionales y 12 pruebas de asimilación para la identificación de bacilos Gram negativos. Los resultados fueron interpretados mediante el software (API Web StandAlone®).

Extracción y amplificación del DNA: Para la extracción del DNA los aislamientos seleccionados fueron cultivados en medio LB (Merck) líquido durante 16 horas a 28°C (en agitación a 125 rpm). Luego se centrifugó el contenido de los tubos durante 10 minutos a 10000 rpm y el DNA se extrajo siguiendo la metodología descrita por Branwel *et al.* (27). Finalmente se procedió al secado del precipitado al vacío (Bomba de vacío Memmert), se resuspendió el producto en 150 mL de solución TE y se conservó a -20°C para su posterior utilización.

La amplificación de la subunidad rRNA16S de los aislamientos de *P. fluorescens* y *P. putida* fue ejecutado por PCR. Para la identificación de *P. fluorescens* se utilizaron los cebadores:

16sPSEfluf (⁵TGCATTCAAACACTGACTG³) y 16PSER (⁵AATCACACCGTGGTAACCG³) (28).

Para *P. putida* se utilizó el cebador REPC (⁵GTAGGAGCGGGTTTACCCGCGAA³) (29). Todos los cebadores se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

Las amplificaciones se realizaron en un equipo termociclador (Mastercycler, Eppendorf). Se utilizaron las mezclas de reacción y programas descritos por Scarpellini *et al.* (28) (*P. fluorescens*) y Aranda-Olmedo *et al.* (29) (*P. putida*). Como control negativo se utilizaron 20 µL de mezcla de reacción más 5 µL de agua destilada. Como control positivo se realizó la amplificación del ADN de las cepas de referencia y patrón *P. fluorescens* J-143 y *P. putida* WCS358.

Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en Tampón TBE 1X (0,09mM Tris-borato, 0,002 mM EDTA), teñido con una solución de bromuro de etidio (1 µg.mL⁻¹), de acuerdo al procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (30).

Análisis Biométricos: De forma preliminar, a todas las variables se le realizó la prueba de normalidad de Shapiro y Wilk, y homogeneidad de varianza. Los datos presentaron distribución normal, por lo que se

les realizó la prueba de Tukey (paramétrica). Se utilizó el paquete estadístico Statistica (versión 6.1).

RESULTADOS

Actividad antagonica de los aislamientos frente a *C. trifolii* y *C. pallescens*: En el experimento *in vitro* los aislamientos con características típicas del género *Pseudomonas* mostraron actividad antagonica

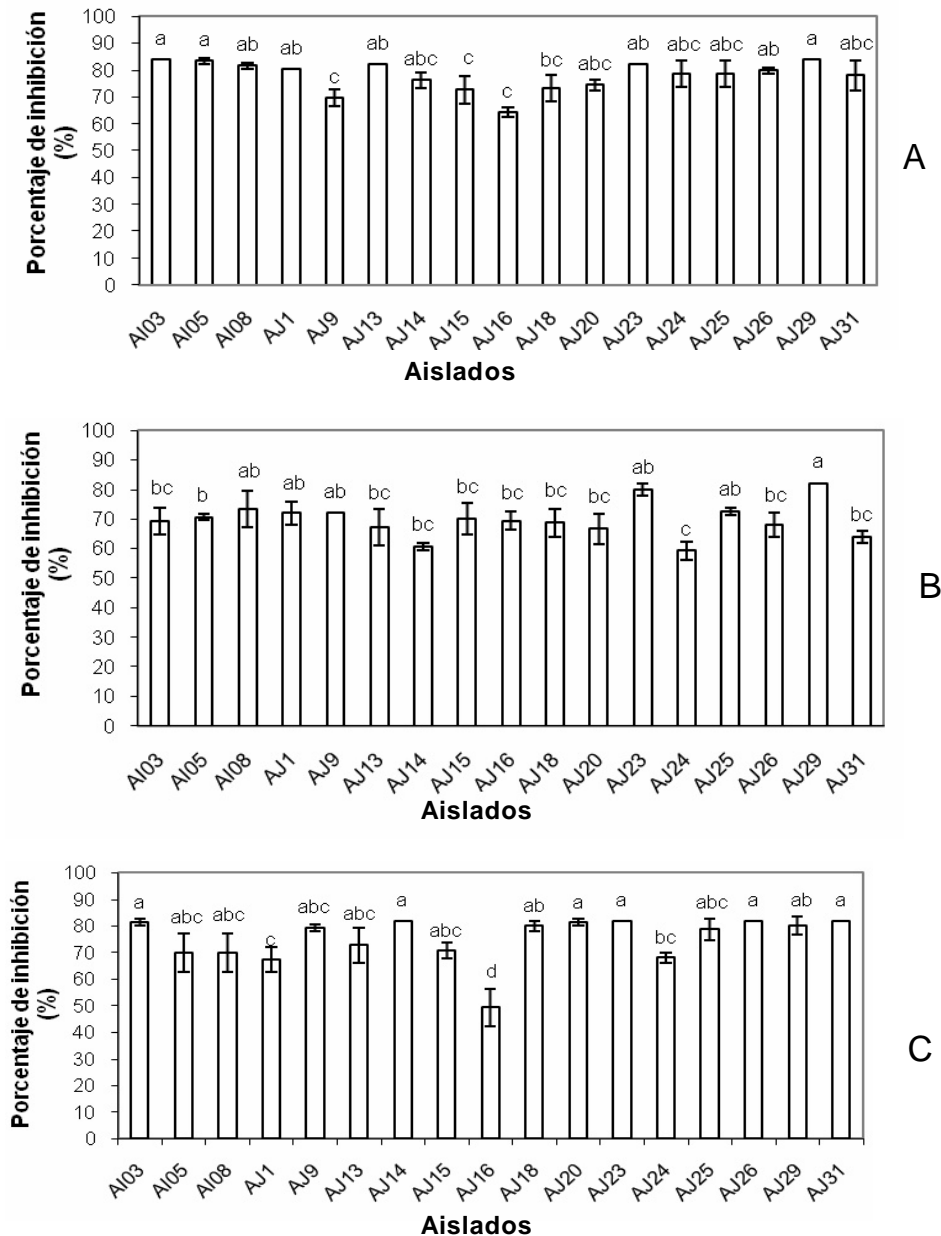


FIGURA 1. Efecto antagonico de los aislamientos bacterianos frente a (A): *C. pallescens* CH5, (B): *C. pallescens* AAD-430 y (C): *C. trifolii* AAD-533.)/ *Antagonistic effect of the bacterial isolates against (A): C. pallescens* CH5, (B): *C. pallescens* AAD-430 and (C): *C. trifolii* AAD-533.

Letras no comunes indican diferencias significativas según prueba de Tukey (I=Desviación estándar de la media).

frente a las cepas fúngicas en estudio. Al enfrentar los 17 aislamientos bacterianos a la cepa CH5 de *C. pallescens*, se demostró que todos presentan efecto antagónico ante el fitopatógeno (Fig. 1A), con valores del 64% hasta un 83% de inhibición del crecimiento del hongo. Con respecto a la cepa *C. pallescens* AAD-430, se observó que las cepas inhibieron el crecimiento fúngico desde un 59% hasta el 82% (Figura 1B). En el caso del enfrentamiento de los aislamientos a la cepa *C. trifolii* AAD-533 (Fig. 1C), se demostró que estas tenían la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo desde un 49% hasta un 82%.

Identificación de los aislamientos seleccionados mediante métodos convencionales: El análisis de los resultados de las pruebas fisiológico-bioquímicas mediante el micrométodo API20NE (bioMérieux S.A., Francia) (Tabla 2) demostró que los aislamientos AI05, AI08 y AJ25 pertenecen a las especie *P. fluorescens* y los aislamientos AI03, AJ9, AJ13, AJ14, AJ15, AJ16, AJ18, AJ20, AJ23, AJ24, AJ25, AJ26, AJ29 y AJ31 a la especie *P. putida*.

Las pruebas bioquímicas relacionadas son: NO₃: asimilación de nitratos, TRP: formación de indol, GLU:

fermentación de glucosa, ADH: arginina dihidrolasa, URE: ureasa, ESC: hidrólisis de la esculina, GEL: hidrólisis de la gelatina, PNG: β-galactosidasa; asimilación de azúcares: GLU: glucosa, ARA: arabinosa, MNE: manosa, MAN: manitol, NAG: N-acetil-glucosamina, MAL: maltosa, GNT: gluconato de potasio, CAP: ácido cáprico, ADI: ácido adípico, MLT: ácido málico, CIT: citrato trisódico, PAC: ácido fenilacético, OX: citocromo-oxidasa.

Amplificación del DNA de los aislamientos seleccionados: En los perfiles obtenidos, las cepas previamente descritas como *P. fluorescens* forman una banda de aproximadamente 800 pb (Fig. 2B), lo que corrobora los resultados obtenidos por los métodos convencionales y confirma que las cepas AI05, AI08 y AJ25 pertenecen a la especie *P. fluorescens*. Asimismo, en los perfiles relacionados con la especie *P. putida* se observó una sola banda de aproximadamente 630 pb correspondiente al ADNr 16s de *P. putida* (Fig. 2A). Estos resultados confirman que las cepas AI03, AJ9, AJ13, AJ14, AJ15, AJ16, AJ18, AJ20, AJ23, AJ24, AJ25, AJ26, AJ29 y AJ31 se encuentran incluidas en la especie *P. putida*.

TABLA 2. Respuesta de los aislamientos a las pruebas fisiológico-bioquímicas/ *Results of the physiological and biochemical tests of the isolates*

Aislado	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU2	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
AI03	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AI05	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AI08	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AJ01	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ09	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ13	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ14	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ15	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ16	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ18	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ20	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ23	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ24	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ25	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AJ26	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ29	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
AJ31	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+

Las pruebas bioquímicas relacionadas son: NO₃: asimilación de nitratos, TRP: formación de indol, GLU: fermentación de glucosa, ADH: arginina dihidrolasa, URE: ureasa, ESC: hidrólisis de la esculina, GEL: hidrólisis de la gelatina, PNG: β-galactosidasa; asimilación de azúcares: GLU: glucosa, ARA: arabinosa, MNE: manosa, MAN: manitol, NAG: N-acetil-glucosamina, MAL: maltosa, GNT: gluconato de potasio, CAP: ácido cáprico, ADI: ácido adípico, MLT: ácido málico, CIT: citrato trisódico, PAC: ácido fenilacético, OX: citocromo-oxidasa.

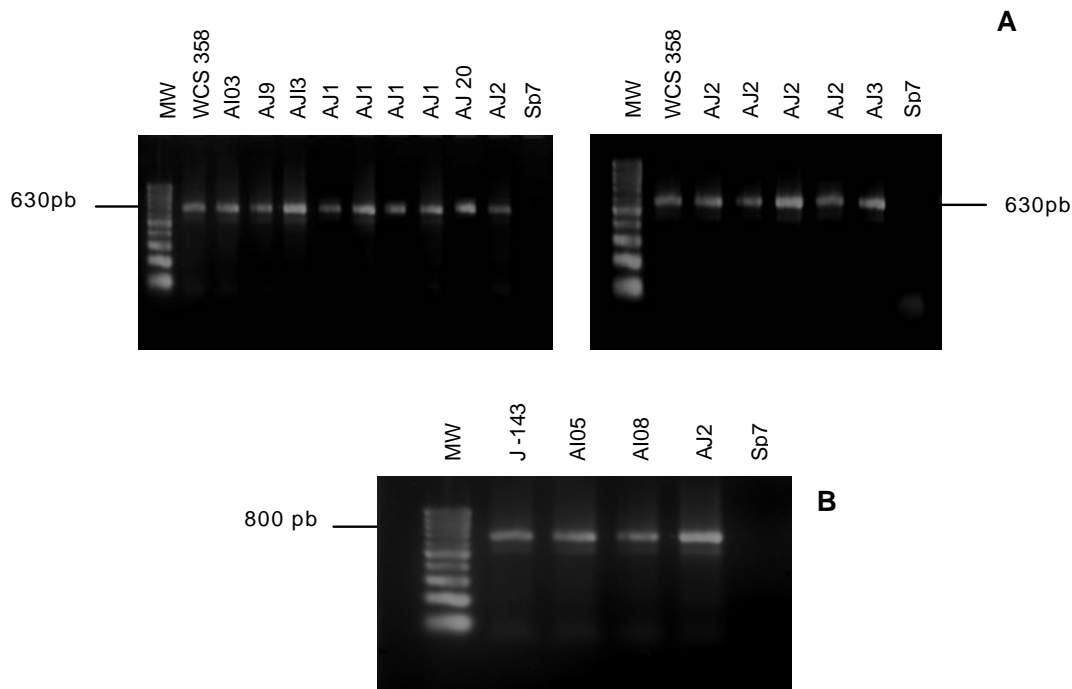


FIGURA 2. Identificación de los aislados mediante la técnica de PCR. (A): REP-PCR, cebador: REPc. Patrón de Peso Molecular (PPM). *P. putida* WCS 358, AI03, AJ9, AJ13, AJ14, AJ15, AJ16, AJ18, AJ20, AJ23, AJ24, AJ25, AJ26, AJ29, AJ31 y *Azospirillum brasilense* Sp7. (B): PCR, cebadores 16sPSEfluF, 16PSER. PPM. *P. fluorescens* J-143, AJ05, AI08, AJ25 and *Azospirillum brasilense* Sp7. / Identification of the isolates by PCR. (A): REP-PCR, primer: REPc. Molecular weight marker (MWM). *P. putida* WCS 358, AI03, AJ9, AJ13, AJ14, AJ15, AJ16, AJ18, AJ20, AJ23, AJ24, AJ25, AJ26, AJ29, AJ31 and *Azospirillum brasilense* Sp7. (B): PCR, primers 16sPSEfluF, 16PSER. MWM. *P. fluorescens* J-143, AJ05, AI08, AJ25 and *Azospirillum brasilense* Sp7.

DISCUSIÓN

La efectividad de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el control biológico de patógenos ha sido informada en diferentes estudios (24, 31, 32, 33). Esta investigación ha revelado que las cepas nativas de pseudomonas fluorescentes, identificadas como *P. fluorescens* y *P. putida*, tienen la capacidad de ejercer efecto antagónico ante las cepas de *C. pallidus* (AAD-430 y CH5) y *C. trifolii* (AAD-533) probadas, especies que son reconocidas como patógenos causantes del manchado del grano en el cultivo del arroz (34), enfermedad que causa pérdidas económicas en Cuba.

Estos resultados se corresponden con los informados por Trujillo *et al.* (26) y Hernández *et al.* (24) que demostraron la actividad antagónica de cepas de *P. fluorescens* ante los patógenos fúngicos *Fusarium* y *Curvularia*. Actividad antagónica similar ante patógenos fúngicos ha sido encontrada en estudios realizados por Rives *et al.* (12) y Acebo (20) que demostraron la efectividad de cepas de *Pseudomonas* contra *P. grisea*.

Este comportamiento coincide además con lo informado por Srivastava y Shalini (35) que utilizaron cepas de *P. fluorescens* para inhibir el crecimiento de *Curvularia lunata* (Wakk.), patógeno que también está asociado a la enfermedad del manchado del grano.

Se ha demostrado que *Pseudomonas* constituye un excelente ejemplo de la combinación de múltiples mecanismos para ejercer un efectivo control biológico. Se destaca por producir diversos metabolitos con actividad antimicrobiana hacia otras bacterias y hongos. Entre ellos pudieran citarse la producción de sideróforos (36,37), metabolitos antifúngicos (38) y enzimas líticas (39). Además de la competencia por nutrientes y hábitat (40) y el establecimiento o inhibición de sistemas de moléculas señales en el patógeno (14,41,42).

La producción de sideróforos podría influir en los resultados que se presentan, ya que los bioensayos *in vitro* se desarrollaron en medio King B que tiene bajo contenido de hierro y favorece la producción de este tipo de metabolitos (43,44). Acebo (20) demostró que estas cepas tienen la capacidad de producir sideróforos

bajo condiciones limitantes de hierro en el medio de cultivo Agar Casamino Ácido (al que se adiciona la solución indicadora CAS), observando la formación del halo de color naranja alrededor de la colonia bacteriana, que denota un resultado positivo, a partir de las 7 horas de crecimiento para algunos aislados (AI03, AJ13, AJ29 y AJ31).

En los resultados también podría haber influido la producción de compuestos autoinductores del tipo acil homoserin lactonas (AHL) por las cepas, lo que fue previamente demostrado por Acebo (20). Las AHLs resultan importantes en la regulación de diferentes funciones bacterianas, como la síntesis de antibióticos, producción de factores de virulencia y crecimiento bacteriano expansivo (45).

En este estudio no se observó efecto diferencial de las cepas ante los patógenos fúngicos estudiados (Fig. 2), lo que se corresponde con los resultados informados por Hernández *et al.* (24), al enfrentar rizobacterias ante cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.). Sin embargo, Jaiganesh *et al.* (46) y Acebo (20), señalaron que al establecerse la interacción entre los antagonistas y los fitopatógenos, existía una variedad de respuestas en función de las cepas, lo que podría estar dado por las características propias de cada microorganismo, que responden con diferentes niveles de resistencia ante el antagonista aplicado.

De modo general, se demuestra que los aislamientos de pseudomonas fluorescentes que presentaban actividad antagónica ante *P. grisea*, también la presentaban ante las cepas de *Curvularia* estudiadas, lo que indica las potencialidades de estas rizobacterias como agentes de control biológico de patógenos fúngicos en el cultivo del arroz. Este comportamiento, unido a la producción de metabolitos con actividad antifúngica, podría indicar las potencialidades de las cepas de PGPB en estudio en el control biológico, sin embargo, se deben realizar estudios *in vivo* e *in situ* para confirmar esta hipótesis.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Universidad de La Habana como parte del proyecto Alma Mater "Empleo de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal para el desarrollo de agroecosistemas arroceros sostenibles". Los autores agradecen a Aleida Romero Sacerio por el apoyo en la realización de la parte práctica del trabajo.

REFERENCIAS

1. Arregocés O, Rosero M, González J. Guía de estudio. Morfología de la Planta de Arroz: Cali; 2005; 20p.
2. MINAGRI. Instructivo Técnico de Arroz., Centro Nacional de Sanidad Vegetal; La Habana; 2006.p.50-55.
3. Pinciroli M, Sisterna MN, Bezus R, Vidal AA. Manchado del grano de arroz: efecto de la fertilización nitrogenada. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata. 2004;105(2):88-96.
4. Neningen H, Barrios LM, Hidalgo EI. Micobiota asociada y patogénica presente en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) nacional e importada en Cuba. Phytopathology 2002; 92 (6) S128.
5. Gutiérrez SA. Micoflora asociada a granos manchados de arroz. En: XI Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Río Cuarto, Córdoba, Argentina: 2002; 29p.
6. Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr Op Plant Biol. 2001; 4:343-350.
7. Matiru VN, Dakora F. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. African J Biotech. 2004;3: 1-7.
8. Hernández-Rodríguez A, Heydrich-Pérez M, Diallo B, El Jaziri, M., Vandeputte OM. Cell-free culture medium of *Burkholderia cepacia* improves seed germination and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). Plant Growth Regul. 2010;60:191-197.
9. Velusamy P, Immanuel JE, Gnanamanickam SS, Thomashow L. Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. Can J Microbiol. 2006;52:56-65.
10. Joshi F, Archana G, Desai A. Siderophore Cross-Utilization Amongst Rhizospheric Bacteria and the Role of Their Differential Affinities for Fe³⁺ on Growth Stimulation Under Iron-Limited Conditions. Curr Microbiol. 2006;53:141-147.

11. Rives N, Acebo Y, Hernández-Rodríguez A. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales* 2007;28(2):29-38.
12. Rives N, Acebo Y, Almaguer M, García JC, Hernández A. Actividad antagónica frente a *Pyricularia grisea* (Sacc.) y fitoestimulación en el cultivo del arroz de cepas autóctonas de *Pseudomonas putida* (Trev.). *Rev Protección Veg* 2009;24(2):106-116.
13. Jhaa B, Thakura MC, Gontiaa I, Albrechtb V, Stoffelsb M, Schmidb M, et al. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *Eur J Soil Biol.* 2009;45:62-72.
14. Bolwerk A, Lagopodi AL, Wijffjes AHM, Lamers GEM, Chin-A-Woeng TFC, Lugtenberg, BJJ, et al. Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Biocontrol Strains with the Phytopathogenic Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *MPMI.* 2003;16(11):983-993.
15. Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environm.* 2003;26:189-199.
16. Schouten A, van den Berg G, Edel-Hermann V, Steinberg C, Gautheron N, Alabouvette C, et al. Defense Responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-Diacetylphloroglucinol, a Broad-Spectrum Antibiotic Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *MPMI* 2004;17(11):1201-1211.
17. Allaire M. Diversité fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizosphères de conifères en pépinières et en milieu naturel Thèse de Maître ès Sciences. Québec, Canada: Université Laval. 2005, 90 p.
18. Cazorla FM, Duckett SB, Bergström ET, Noreen S, Odijk R, Lugtenberg BJJ, et al. Biocontrol of Avocado Dematophora Root Rot by Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* PCL1606 Correlates With the Production of 2-Hexyl 5-Propyl Resorcinol. *MPMI* 2006;19(4):418-428.
19. Yang D, Wang, B, Wang J, Chen Y, Zhou M. Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *Sclerotinia* stem rot of rape. *Biological Control* 2009;51(1): 61-65.
20. Acebo Y. Aislamiento y caracterización de cepas de pseudomonas fluorescentes con actividad antagónica ante *Pyricularia grisea*. Departamento de Microbiología y Virología. La Habana, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Tesis en opción al Título Académico de Maestro en Microbiología; 2009. 88p.
21. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9na Edition. Editors N.R. Krieg and J. Holt. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore. London; 1994.
22. Almaguer M, Rojas TI, Batista A, Benitez M, Rives N, Hernández A. Detección de *Pyricularia grisea* y *Curvularia* sp. en áreas arroceras en Instituto de Investigaciones del arroz. *Revista Cubana del Arroz* 2007; 174-177.
23. Mena Portales JDJ. Taxonomía del complejo *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* y *Exserohilum* en Cuba. Instituto de Ecología y Sistemática, La Habana; 2004; 108p.
24. Hernández A, Heydrich M, Acebo Y, Velázquez MG, Hernández AN. Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). *Appl Soil Ecol.* 2008;36:184-186.
25. Harrigan WF, Mac Cance M. Métodos de Laboratorio en Microbiología. E. Academia. León, España; 1968; 426p.
26. Trujillo I, Díaz A, Hernández-Rodríguez A, Heydrich M. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. *Rev Protección Veg.* 2007;2:7-14.
27. Bramwel PA, Barallon RV, Rogers HJ, Bailey MJ. Extraction and PCR amplification of DNA from the rhizoplane. *Molecular Microb Ecol Man;* 1995;1.4.2:1-20.
28. Scarpellini M, Franzetti L, Galli A. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiology Letters.* 2004;236(2):257-260.
29. Aranda-Olmedo I, Tobes R, Manzanera M, Ramos JL, Marqués S. Species-specific repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in

- Pseudomonas putida*. Nucleic Ac Res. 2002;30(8):1826-1833.
30. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Edition; 1989; 1090 pp.
 31. Bashan Y, de-Bashan LE. Plant Growth-Promoting Bacteria. Encyclopedia of soils in the environment. D. Hillel. Oxford, U.K., Elsevier; 2005;1:103-115.
 32. Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora RA, Ulrich A, Hallmann J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS (Fed Eur Microbiol Soc) Microbiol Ecol 2005;51:215-229.
 33. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Ait Barka E. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Appl Environ. Microbiol. 2005;71:4951-4959.
 34. Estrada G, Sandoval I. Patogenicidad de especies de *Curvularia* en arroz. Fitosanidad. 2004;8:23-26.
 35. Srivastava R Shalini S. Antifungal Activity of *Pseudomonas fluorescens* against different plant pathogenic fungi. EJEAFChe 2008;7:2881-2889.
 36. Cornelis P, Matthijs S. Diversity of siderophore mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonas: not only pyoverdines. Environ. Microbiol. 2002;4:787-798.
 37. Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiol Res. 2008;163(2):173-181.
 38. Rezzonico F, Zala M, Keel C, Duffy B, Moënne-Loccoz Y, Défago G. Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonas to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? New Phytologist. 2007;173:861-872.
 39. Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang Y, *et al.* Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. System Appl Microbiol. 2005;28:66-76.
 40. Martínez-Granero F, Rivilla R, Martín M. Rhizosphere Selection of Highly Motile Phenotypic Variants of *Pseudomonas fluorescens* with Enhanced Competitive Colonization Ability. Appl Environ Microbiol. 2006;72(5):3429-3434.
 41. Bertani I, Venturi V. Regulation of the N-Acyl Homoserine Lactone-Dependent Quorum-Sensing System in Rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and Cross-Talk with the Stationary-Phase RpoS Sigma Factor and the Global Regulator GacA. Appl Environ Microbiol. 2004;70(9):5493-5502.
 42. Preston GM. Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. Phil. Trans. R. Soc. Lond; 2004; B 359:907-918.
 43. Loper JE, Henkels MD. Utilization of Heterologous Siderophores Enhances Levels of Iron Available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere. Appl Environ Microbiol. 1999;65(12):5357-5363.
 44. Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonas. Nature Reviews Microbiol. 2005;3:307-319.
 45. Keller L, Surette MG. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. Nature Reviews Microbiol. 2006;4:249-258.
 46. Jaiganesh V, Eswaran A, Balabaskar P, Kannan C. Antagonistic activity of *Serratia marcescens* against *Pyricularia oryzae*. Not Bot Hort Agrobot Cluj. 2007;35(2):48-54.

(Recibido 25-1-2010 ; Aceptado 10-5-2010)