

BACTERIAS DEL SUELO Y SU CAPACIDAD PARA INHIBIR A HONGOS PATÓGENOS DE LAS PLANTAS

López SMY^{*1}; Medina R²; Franco MEE³ y Balatti PA^{1,3}.

1-Instituto de Fisiología Vegetal - UNLP- CONICET; Diagonal 113 y 61, La Plata. 2- Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales; calle 50 y 115, La Plata. 3- Centro de Investigaciones en Fitopatología – UNLP; calle 60 y 119, La Plata.

(*Autor: smyld03@hotmail.com)

Introducción:

La rizósfera, se ha definido como el volumen del suelo que se encuentra próximo a la raíz, sitio en donde tanto la cantidad como la actividad de microorganismos es mayor [1]. Es decir, que la rizósfera es un ambiente en donde los metabolitos liberados por la planta influyen la actividad tanto de los microorganismos patógenos como benéficos afectando la sanidad y el crecimiento de las plantas. Los microorganismos que habitan en la rizósfera incluyen bacterias, hongos, virus y nematodos, entre otros [2].

En el suelo se encuentran bacterias, especialmente de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, que inhiben a los patógenos, sobre todo hongos, para lo cual sintetizan compuestos con actividad antifúngica. Otras especies y/o cepas bacterianas sintetizan inhibidores como por ejemplo los antibióticos [3]. Toyoda y Utsimi (1991) [4] demostraron que cepas de *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas solanacearum* hidrolizan el ácido fusárico, que es un agente causal del marchitamiento cuando las plantas son afectadas por *Fusarium*.

Rhizoctonia solani es hongo fitopatógeno que ataca a un amplio rango de cultivos. Las semillas y las plántulas son particularmente susceptibles a este hongo, que persiste en el suelo en forma de esclerocios [5]. Si bien existen fungicidas que se utilizan para el control de *R. solani*, estos no siempre son eficientes. Adicionalmente, recientemente se ha puesto énfasis en el aislamiento de organismos del suelos que tienen potencial para el desarrollo de formulados para control biológico de organismos patógenos [6].

A partir de cultivos de diluciones de suelo realizados con fines de aislar ciertos hongos identificamos microorganismos que demostraron ser antagonistas de diversos hongos, por lo que hipotetizamos que los mismos puede ser también antagonistas de *R. solani*.

El objetivo de este trabajo fue analizar las interacciones entre microorganismos con capacidad antagonista sobre organismos patógenos de los cultivos.

Materiales y métodos

Se aislaron organismos patógenos y antagonistas, estos se identificaron en base a características morfológicas y a las secuencias ribosomales, además se evaluó la capacidad antagonista de los aislamientos in vitro.

Aislamientos de hongos patógenos de soja, maíz y sorgo: *Rhizoctonia solani* y otros hongos patógenos como *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia bataticola* y *Stenocarpella maydis*, se aislaron a partir de tejido vegetal infectado. Se cortaron trozos de 0,5 cm de largo los que esterilizaron superficialmente con alcohol al 50% durante 1 min, hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, luego de lo cual se lavó con agua destilada estéril. Estos trozos se colocaron en medio de cultivo selectivo suplementado con cloranfenicol, estreptomina y fosetil-alumino (fungicida). Cultivos de los aislados en agar papa glucosado (APG) fueron utilizados para el análisis microscópico de las características morfológicas. A partir de las placas de las que se seleccionaron los patógenos se aislaron y purificaron un total de 14 bacterias que mostraban antagonismo con los hongos de interés.

Extracción de ADN e identificación mediante secuenciación de ITS: La extracción de ADN se realizó utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification – Promega. El ADN se cuantificó en gel de agarosa 0,7% teñido con bromuro de etidio, en relación al marcador lambda/*Hind*III – Fermentas.

Con los primers universales ITS4-ITS5 se amplificó la secuencia ribosómica conocida como ITS (Internal Transcribed Spacer). Con la secuencia de los organismos se realizó un Blast (con la herramienta de alineamiento básico local Blast - NCBI) con lo que se confirmó la identidad de los aislamientos

Evaluación cualitativa del antagonismo de microorganismos: En un primer ensayo se realizó un screening de actividad antifúngica de los microorganismos aislados y de *Bacillus megaterium* (un antagonista evaluado en ensayos previos). Las bacterias antagonistas se sembraron en estrías rectas que dividieron la placa de Petri en cuatro cuadrantes. Cada uno de esos cuadrantes fue inoculado con un hongo patógeno de cultivos extensivos e intensivos como cultivos de hortalizas. El medio de cultivo fue APG c/cloranfenicol o Agar nutritivo. En el centro de cada cuadrante se colocó un cilindro de 5 mm de diámetro de *F. graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia bataticola* y *Stenocarpella maydis*. Las cajas se incubaron a 26°C durante 3 días. A los 3 días de la inoculación se midió el diámetro de las colonias de los tratamientos y de los controles sin bacterias antagonistas.

Resultados y discusión

A partir de plantas enfermas de soja, sorgo y maíz provenientes de diferentes regiones de la Provincia de Buenos Aires se aislaron hongos patógenos, que se identificaron en base a la morfología y a la secuencia del ITS como representantes de: *F. graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia bataticola* y *Stenocarpella maydis*.

En los medios de aislamiento de los patógenos se detectó la presencia de colonias bacterianas las que se cultivaron en agar nutritivo y se realizaron stocks de almacenamiento a partir de los cultivos puros. El número total de aislados bacterianos obtenidos fue de 14 (A, B, C, D, 5, E1, E2, 6, F1, F2, 7, G1, G2 Y G3) a los que se le adicionaron dos aislados de trabajos previos identificados como *Bacillus megaterium* (DM10 y DM59).

Se procedió a evaluar la capacidad antagonista de los aislados hacia hongos patógenos en placas. Luego del período de incubación se observaron, y se midió el diámetro de las colonias de los hongos en las placas controles (sin inoculación bacteriana) y en las placas sembradas con los patógenos. Se encontró que las cepas 5, F1 y G2 inhibieron por completo el desarrollo de las colonias de *F. graminearum*, *R. bataticola* y *S. maydis*. Además inhibieron el desarrollo circular de la colonia de *R. solani*, que no creció en la región del cuadrante próxima a las estrías bacterianas y se deformó creciendo lentamente hacia el borde circular de la placa donde no se inoculó la bacteria.

También se observó que las estrías bacterianas de *B. megaterium* DM10 y DM59 si bien inhibieron el crecimiento de los hongos patógenos, el nivel de antagonismo fue inferior al del resto de los aislados.

Conclusiones

Los microorganismos antagonistas aislados inhibieron el crecimiento de los hongos patógenos incluidos los aislamientos de *Rhizoctonia*.

La capacidad antagonista es una capacidad variable e intrínseca de cada aislado. La capacidad antagonista diferencial de los aislados probablemente se deba a que estos microorganismos inhiben el crecimiento de los hongos patógenos por medio de distintos mecanismos, y en este caso podrían utilizarse cooperativamente.

Bibliografía

- [1] Westover K, Kennedy A, Kellys S. 1997. Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. *J Ecol* 85: 863-873.
- [2] Johansson F, Paul L, Finlay R. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol Ecol*, 48: 1-13.
- [3] Whipps JM. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp Bot*, 52: 487-511.
- [4] Toyoda H, Utsumi R. 1991. Method for the prevention of *Fusarium* diseases and microorganisms used for the same. *United States Patent Number: 4,988,586*.
- [5] Domsch KH, Gams W, Anderson TH. 1980. Compendium of soil fungi. London, England: Academic Press. 865 p.
- [6] Crowe JD, Olsson S. 2001. Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2088–2094.