

## SELECCIÓN DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES NATIVAS PARA CONTROLAR ENFERMEDADES DE IMPLANTACIÓN EN PRADERAS

Bajsa, N.<sup>1</sup>; Quagliotto, L.<sup>1</sup>; Yanes, M.L.<sup>1</sup>; Vaz, P.<sup>1</sup>; Azziz<sup>1</sup>, G.;  
De La Fuente, L.<sup>1</sup>; Bagnasco, P.<sup>1</sup>; Davyt, D.<sup>2</sup>; Pérez, C.<sup>3</sup>; Ducamp, F.<sup>3</sup>;  
Altier, N.<sup>4</sup>; Arias, A.<sup>1</sup>

### RESUMEN

En Uruguay, las leguminosas forrajeras juegan un rol importante en la producción agropecuaria. Pérdidas importantes en su establecimiento son causadas por la enfermedad conocida como damping-off. Investigaciones conducidas en el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE, han llevado a la selección de cepas nativas de *Pseudomonas* fluorescentes que controlan fitopatógenos de los géneros *Pythium* y *Rhizoctonia*, tanto *in vitro* como *in vivo* en plantas de *Lotus corniculatus* (lotus) y *Medicago sativa* (alfalfa). Se caracterizaron los mecanismos antagonísticos de dichas bacterias, detectándose la producción de ácido cianhídrico, sideróforos, antibióticos, biosurfactantes y exoproteasas. Se estudió la interacción con cepas de rizobio, observándose que la presencia de las *Pseudomonas* no afectó parámetros relacionados con la simbiosis, tales como peso seco de las plantas, tasa de nodulación y colonización rizosférica. Ensayos realizados en condiciones de campo mostraron efecto protector del damping-off de tres cepas de *P. fluorescens* utilizadas, en las condiciones experimentales en que se produjo enfermedad. Se seleccionó un medio de cultivo adecuado para la producción de biomasa bacteriana a escala industrial y se observó que la turba estéril es apta como soporte para la formulación de un inoculante que mejore el establecimiento de las pasturas utilizando una tecnología no agresiva para el ambiente como es el control biológico.

**PALABRAS CLAVE:** bacterias rizosféricas, control biológico, interacciones microbianas, leguminosas forrajeras.

### SUMMARY

## SELECTION OF NATIVE FLUORESCENT *Pseudomonas* FOR THE CONTROL OF PASTURE SEEDLING DISEASES

In Uruguay, forage legumes play an important role in farming production. Important losses in their establishment are caused by damping-off disease. Research conducted in the Laboratory of Microbial Ecology of the IIBCE, has led to the selection of native fluorescent *Pseudomonas* strains that control plant pathogens of the genera *Pythium* and *Rhizoctonia*, *in vitro* and *in vivo* in *Lotus corniculatus* (lotus) and *Medicago sativa* (alfalfa) plants. Antagonistic mechanisms of these bacteria were characterized, and production of cyanide, siderophores, antibiotics, biosurfactants and exoproteases was detected. The interaction with rhizobial strains was studied, and it was observed that the presence of *Pseudomonas* did not affect symbiosis-related parameters such as plant dry weight, nodulation rate and rhizospheric colonization. Assays under field conditions showed damping-off protection by the three *P. fluorescens* strains used, in experimental conditions conducive for disease. A culture media adequate for industrial scale biomass production was selected and it was observed that sterile peat is apt as a carrier for the formulation of an inoculant for improving pasture establishment using an environmentally friendly technology as biological control.

**KEY WORDS:** biological control, forage legumes, microbial interactions, rhizospheric bacteria.

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Av. Italia 3318. CP 11600. Montevideo, Uruguay. Unidad Asociada a Facultad de Ciencias, UdelaR. [nbajsa@iibce.edu.uy](mailto:nbajsa@iibce.edu.uy).

<sup>2</sup> Cátedra de Química Farmacéutica. Facultad de Química, UdelaR. Gral. Flores 2124. Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup> Estación Experimental "Dr. Mario A. Cassinoni", Facultad de Agronomía, UdelaR. Ruta 3 km 363. CP 60000. Paysandú, Uruguay.

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Las Brujas. CP 90200. Canelones, Uruguay.

## INTRODUCCIÓN

En Uruguay las leguminosas forrajeras juegan un rol importante en la producción agropecuaria, siendo la principal fuente de alimento de alta calidad para el ganado. Su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, en asociación simbiótica con rizobio, contribuye a la sustentabilidad de las rotaciones de cultivos con pasturas. Sin embargo, pérdidas importantes en su establecimiento son debidas a patógenos del suelo, principalmente hongos, responsables de la baja persistencia y disminución en su rendimiento. El damping-off de pre- y pos-emergencia es una de las principales enfermedades y es causada por integrantes de los géneros *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*. Generalmente, dicha enfermedad no puede ser evitada mediante rotaciones de cultivos ni el desarrollo de variedades vegetales resistentes (Altier, 1996; Altier, 2000).

En los últimos años, las *Pseudomonas* fluorescentes han recibido mucha atención como agentes de control biológico para la supresión de microorganismos patógenos de raíz, mejorando el crecimiento vegetal y el rendimiento de los cultivos (Weller, 1988; Weller *et al.*, 2002).

En esta revisión se presentan resultados de investigaciones del Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE, junto al INIA y a la UdelaR, orientados a la selección de cepas nativas de *Pseudomonas* fluorescentes para el control de enfermedades de implantación de leguminosas forrajeras. Se describen las etapas de aislamiento, selección y caracterización de las cepas, y de formulación de un inoculante con el objetivo de mejorar el establecimiento de las pasturas utilizando una tecnología no agresiva para el ambiente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento de agentes de control biológico

En Uruguay no se cuenta con registros de suelos supresivos para enfermedades de implantación, por lo que las *Pseudomonas* fluorescentes fueron aisladas a partir de plantas sanas de *Lotus corniculatus* (lotus) y *Medicago sativa* (alfalfa). Las plantas de lotus fueron colectadas en dos regiones diferentes de Uruguay: Colonia y Tacuarembó, mientras que las de alfalfa fueron colectadas también en Paysandú. Se sembraron suspensiones de suelo rizosférico en un medio de cultivo deficiente en Fe(III) y se seleccionaron aquellas colonias bacterianas que fluorescían bajo luz UV. Se obtuvieron 541 aislamientos a partir de lotus y 703 a partir de alfalfa (Bagnasco *et al.*, 1998; Yanes *et al.*, 2004).

### Selección de cepas antagonistas

#### *Antagonismo in vitro*

La selección de aislamientos capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de fitopatógenos fue realizada mediante ensayos de cultivo dual. Se evaluó la capacidad de los 541 aislamientos obtenidos de lotus para inhibir el crecimiento de *Pythium ultimum* y *Rhizoctonia solani*, en dos medios de cultivo diferentes. El 12% mostró efectos antagonísticos disminuyendo o deteniendo el crecimiento fúngico de *P. ultimum*. Sin embargo, sólo un 0,25% y un 5% de los aislamientos obtenidos de Colonia y Tacuarembó, respectivamente, inhibieron el crecimiento de *R. solani* (Bagnasco *et al.*, 1998).

La capacidad de los aislamientos de alfalfa para antagonizar una cepa de *Pythium debaryanum* se evaluó en medio mínimo para *Pseudomonas* (Loper, 1988). Un 11.2% de la colección mostró halos de inhibición superiores a 3mm, correspondiendo un 8.3% a aislamientos provenientes de Tacuarembó. Estos aislamientos provenían de suelo con historia de campo natural, mientras que el resto de la colección provenía de suelos con historia de alfalfa.

#### *Antagonismo in vivo*

Los 20 aislamientos de lotus seleccionados por presentar actividad antagonística *in vitro* fueron caracterizados por su actividad biocontroladora *in vivo*, en ensayos realizados en macetas con suelo natural y bajo condiciones controladas. Tres cepas -UP61, UP143 y UP148- mostraron los mejores resultados: UP61 redujo de 47,4% a 2,4% la infección causada por *P. ultimum* y UP148 redujo de 34,4% a 10,7% la enfermedad causada por *R. solani* (Bagnasco *et al.*, 1998).

Los aislamientos de alfalfa que mostraron actividad inhibitoria *in vitro*, junto con los que presentaban genes para la biosíntesis de antibióticos (ver más adelante), fueron analizados *in vivo* bajo condiciones controladas para evaluar la capacidad de controlar el damping-off causado por *P. debaryanum*. De los 101 aislamientos evaluados, cinco -aT688, aT633, aP271, aP388 y aC119- mostraron capacidad protectora de alfalfa. También fue evaluada la capacidad de promoción directa del crecimiento de alfalfa en ausencia del patógeno, donde se destacaron cuatro de los cinco aislamientos anteriores (Yanes *et al.*, 2004).

## Caracterización de los aislamientos seleccionados

### Clasificación taxonómica

La identificación fenotípica de los aislamientos de lotus fue realizada mediante el sistema Oxi/Ferm Tubes II (Roche) y ensayos de arginina dihidrolasa y gelatinasa, y la de los aislamientos de alfalfa por el sistema API 20NE (Biomerieux). De esta forma se pudo determinar que los aislamientos seleccionados pertenecen a la especie *Pseudomonas fluorescens* (Bagnasco *et al.*, 1998; Yanes *et al.*, 2005).

### Mecanismos antagonísticos

Los mecanismos por los cuales las *Pseudomonas* fluorescentes ejercen su efecto benéfico para las plantas involucran la producción de diversos metabolitos microbianos que incluyen sideróforos, antibióticos y compuestos volátiles como el HCN (Thomashow and Weller, 1996; Weller *et al.*, 2002). En condiciones de ausencia de hierro, estas bacterias producen sideróforos que secuestran las trazas de Fe(III) en el suelo y le sustraen este elemento a microorganismos rizosféricos deletéreos (Buysens *et al.*, 1996). La producción de antibióticos como mecanismo para controlar diversos fitopatógenos ha sido ampliamente demostrada. En particular, entre las *Pseudomonas* fluorescentes ha sido descrita la producción de 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), pioluteorina (Plt), pirrolnitrina (Prn), derivados de la fenazina (Phz) y biosurfactantes (Thomashow and Weller, 1996; Stanghellini and Miller, 1997). Enzimas líticas que degradan las paredes de hongos están involucradas también en el control biológico de ciertos fitopatógenos (Fridlender *et al.*, 1993).

Se observó que la producción de compuestos antifúngicos por las cepas seleccionadas no depende de la concentración de hierro en el medio, por lo que los sideróforos no estarían involucrados en su actividad antagonística. Se evaluó la producción de ácido cianhídrico, utilizando ácido pícrico como indicador. Las cepas UP61, UP143, UP148, aC119, aP271 y aP388 producen HCN, y se observó que las cepas de alfalfa inhiben a *P. debaryanum* por medio de compuestos volátiles. En ensayos utilizando un medio de cultivo sólido conteniendo leche, se determinó que las cepas de lotus y aP388, aT633 y aT688 de alfalfa liberan exoproteasas, produciendo un halo de hidrólisis en dicho medio (Bagnasco *et al.*, 1998; Yanes *et al.*, 2005).

Se buscó en estas cepas la presencia de genes biosintéticos para los cuatro antibióticos más comunes en *Pseudomonas* fluorescentes. Mediante PCR y utilizan-

do cebadores específicos para enzimas clave de las rutas biosintéticas, se detectaron los genes responsables para la síntesis de DAPG, Plt y Prn en la cepa UP61. La producción de estos tres antibióticos en cultivos de dicha cepa fue detectada posteriormente por HPLC (De La Fuente *et al.*, 2004). Por otra parte, menos del 5% de los aislamientos de alfalfa mostró la presencia de alguno de estos genes. Solamente *P. fluorescens* aP388 presentó genes para la síntesis de Phz, mientras que todos los aislamientos, excepto aT688, fueron capaces de producir biosurfactantes.

En el caso de *P. fluorescens* UP143 y UP148, no se logró amplificar por PCR las secuencias buscadas, indicando que estas cepas producen antibióticos diferentes a los descritos previamente. Para aislar y posteriormente identificar estos compuestos se realizaron extracciones orgánicas a partir de sobrenadante de cultivo de las bacterias. El antibiótico producido por la cepa UP148 fue purificado y parcialmente caracterizado por técnicas espectroscópicas, observándose que es un derivado de la fenazina no descrito anteriormente, con un grupo hidroxilo y otro metanocarboxilo como sustituyentes (Bagnasco, 1997). Mediante mutagénesis generalizada, se obtuvieron derivados de esta cepa incapaces de inhibir a *P. ultimum* y con capacidad reducida para producir el antibiótico y otros factores antifúngicos. En experimentos *in vivo*, se observó que la actividad biocontroladora de la cepa UP148 es resultado de la combinación de múltiples factores antifúngicos que protegen las plantas de lotus de la infección causada por el patógeno (Bajsa, 2000). Actualmente se está trabajando en la caracterización del antibiótico producido por la cepa UP143, que probablemente también tenga una estructura química aun no descrita.

### Interacciones *Pseudomonas*- rizobio

Para la aplicación práctica de estos resultados, cepas de rizobio y *Pseudomonas* deberían ser inoculadas simultáneamente en semillas de leguminosas, por lo que es importante considerar las interacciones entre estas dos bacterias. Se evaluó el efecto de la inoculación con las cepas aisladas de lotus sobre la simbiosis de especies de rizobio con lotus, alfalfa y trébol blanco (*Trifolium repens*). Se consideraron diferentes parámetros incluyendo la inhibición *in vitro* de rizobio por *Pseudomonas*, el peso seco de la parte aérea de las plantas, la tasa de nodulación y la colonización radicular de ambas bacterias. Las cepas *P. fluorescens* UP61, UP143 y UP148 presentaron actividad antagonística frente a cepas de *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti* únicamente en medios de cultivo con baja concentración de hierro. Además, una mutante de la cepa UP148 deficiente en la producción de sideróforos

no afectó el crecimiento de cepas de rizobio, sugiriendo que estos quelantes de hierro son responsables de la inhibición observada *in vitro*. Sin embargo, la presencia de *Pseudomonas* no afectó los otros parámetros estudiados relacionados a la simbiosis (De La Fuente *et al.*, 2002).

Las *Pseudomonas* fluorescentes son capaces de colonizar rápida y agresivamente el sistema radicular, lo que las hace excelentes candidatas como agentes de control biológico. Experimentos de colonización rizosférica por *Pseudomonas* y rizobio demostraron que mientras las poblaciones de *Pseudomonas* disminuyeron significativamente a lo largo del tiempo, independientemente de la presencia de rizobio, las poblaciones de este último se mantuvieron siempre constantes. Contrastes entre tratamientos co-inoculados y tratamientos inoculados sólo con una cepa de *Pseudomonas*, mostraron que el número de UFC de éstas/g de raíz en plantas co-inoculadas es igual o significativamente mayor que en los controles sin rizobio (De La Fuente *et al.*, 2002).

### Ensayos en campo

Con el objetivo de evaluar la efectividad de las cepas de *Pseudomonas fluorescens* UP61, UP143 y UP148 para controlar enfermedades de implantación en lotus o alfalfa en condiciones de campo, se instalaron 20 ensayos en dos estaciones experimentales del INIA y en la EEMAC (Facultad de Agronomía, UdelaR). Los tratamientos con las cepas de *P. fluorescens* tuvieron un comportamiento intermedio respecto al testigo y al tratamiento con fungicida. Sin embargo, a pesar de la gran variabilidad observada, hubo efecto protector del damping-off de las tres cepas de *P. fluorescens* utilizadas, en las condiciones experimentales en que se produjo enfermedad. Las poblaciones rizosféricas de *P. fluorescens* de cada tratamiento descendieron significativamente a lo largo del tiempo, mientras que las de rizobio permanecieron constantes (Quagliotto *et al.*, 2004).

### Formulación de un inoculante

La supresión de enfermedades de implantación causada por patógenos del suelo requiere la introducción de bacterias biocontroladoras en altas densidades. La aplicación comercial de *Pseudomonas* fluorescentes sólo es posible si la producción de biomasa bacteriana se realiza a bajo costo, lo cual excluye el empleo de medios de laboratorio. Se evaluó el crecimiento de la cepa *P. fluorescens* UP148 en varias escalas, utilizando diversos medios de cultivo. Se seleccionó un medio (M2G), con glicerol como fuente de carbono y extracto de malta y de levadura como fuente de nitrógeno, como el más adecuado para la pro-

ducción de biomasa bacteriana a escala industrial. En este medio no se observó producción de ácido cianhídrico por la cepa UP148, pero sí la producción del antibiótico fenazínico. El efecto protector de plántulas de lotus frente a la infección causada por *P. debaryanum*, en condiciones controladas, resultó ser independiente del medio de cultivo utilizado para crecer el inóculo bacteriano y de la producción del antibiótico en el mismo (Quagliotto *et al.*, 2004).

La formulación de un producto de biocontrol debe ser compatible con los requerimientos del microorganismo y las prácticas agrícolas. En nuestro país existe una amplia experiencia en el uso de turba como soporte para inoculantes de rizobio. Ensayos de sobrevivencia mostraron que cepas de *Pseudomonas* fluorescentes se mantuvieron en poblaciones del orden de  $10^9$  por gramo de turba luego de 6 meses de inoculadas y conservadas a 4° C (Bagnasco *et al.*, 1998). Estos resultados indican que un inoculante utilizando turba estéril como soporte podría ser desarrollado para mejorar el establecimiento y rendimiento de las leguminosas forrajeras.

### BIBLIOGRAFÍA

- ALTIER, N. 1996. Enfermedades de leguminosas forrajeras: diagnóstico, epidemiología y control. En: Díaz M. (ed.), Manejo de enfermedades en cereales de invierno y pasturas, pp. 87-104. Serie Técnica N° 74, INIA, Montevideo.
- ALTIER, N. 2000. Reconocimiento y manejo de enfermedades en alfalfa. Montevideo, INIA. Boletín de Divulgación No.69:125-143.
- BAGNASCO, P. 1997. Estudio de la capacidad inhibidora de una cepa nativa de *Pseudomonas* fluorescente frente al hongo patógeno *Pythium ultimum*. Tesis de Maestría, Universidad de la República, Facultad de Ciencias.
- BAGNASCO, P.; DE LA FUENTE, L.; GUALTIERI, G.; NOYA, F. & ARIAS, A. 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biol. Biochem.* 30:1317-1322.
- BAJSA, N. 2000. Metabolitos responsables del control biológico producidos por una cepa de *Pseudomonas fluorescens*. Trabajo Especial II Licenciatura en Bioquímica, Universidad de la República, Facultad de Ciencias.
- BUYSENS, S.; HEUNGENS, K.; POPPE, J. & HÖFTE, M. 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:865-871.
- DE LA FUENTE, L.; QUAGLIOTTO, L.; BAJSA, N.; FABIANO, E.; ALTIER, N. & ARIAS, A. 2002. Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* biocontrol

- strains does not affect the symbiosis between rhizobia and forage legumes. *Soil Biol. Biochem.* 34:545-548.
- DE LA FUENTE, L.; THOMASHOW, L.; WELLER, D.; BAJSA, N.; QUAGLIOTTO, L.; CHERNIN, L. & ARIAS, A. 2004. *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:671-681.
- FRIDLENDER, M.; INBAR, J. & CHET, I. 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a b-1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* 25:1211-1221.
- LOPER, J.E. 1988. Role of fluorescent siderophores production in biocontrol of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* 78: 166-172.
- QUAGLIOTTO, L.; AZZIZ, G.; BAJSA, N.; ARIAS, A.; PÉREZ, C.; DUCAMP, F.; CADENAZZI, M.; FERNÁNDEZ, A. & ALTIER, N. 2004. Desarrollo de una tecnología para el control biológico de enfermedades de implantación en leguminosas forrajeras. Resultados Proyecto LIA 028. Montevideo, INIA. Serie LIA 04. Edición en CD-Rom.
- STANGHELLINI, M.E. & MILLER, R.M. 1997. Biosurfactants: Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Dis.* 81: 4-12.
- THOMASHOW, L.S. & WELLER, D.M. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. En: Stacey G. and Keen N. (ed.), *Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1., pp. 187-235. Chapman & Hall, New York.
- WELLER, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.
- WELLER, D.M.; RAAIJMAKERS, J.M.; McSPADDEN GARDENER, B.B. & THOMASHOW, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:309-348.
- WELLER D. M. & THOMASHOW, L.S. 1994. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. En: F. O' Gara, D. N. Dowling y B. Boesten. (eds.) *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms*. pp. 1-18. VCH, New York.
- YANES, M.; DE LA FUENTE, L.; ARIAS, A. & ALTIER, N. 2004. Uso de *Pseudomonas* fluorescentes nativas para promover el crecimiento de la alfalfa y controlar enfermedades de implantación. XX Reunión del Grupo Técnico Regional del Cono Sur en mejoramiento y utilización de los recursos forrajeros del área tropical y subtropical-Grupo Campos. Regional Norte, UdelaR. Salto, Uruguay. (pp194).
- YANES, M.L.; FERNÁNDEZ, A.; ARIAS, A. & ALTIER, N. 2005. Método para evaluar protección contra *Pythium debaryanum* y promoción del crecimiento en alfalfa de *Pseudomonas* fluorescentes. *Agrociencia* (en prensa).