

“CEPAS DE *Bacillus* ANTAGONISTAS DE HONGOS DE SUELO PATÓGENOS EN ARÁNDANO Y OLIVO”

ROSSI, María Sol¹; JONES, Leandro R.²; OTERO, L.³; WRIGHT, Eduardo R.⁴; PÉREZ, Beatriz A.⁴

¹INTA-Instituto de Suelos-CIRN-Castelar msolrossi@cirn.inta.gov.ar ²INTA-CICVYA. ³FIFFIVE-Córdoba; ⁴Fitopatología-FAUBA. ⁵INTA-IMYZA

INTRODUCCIÓN

La mayor parte de la producción mundial de arándanos se obtiene en el hemisferio norte, aproximadamente un 97 % del total producido. Este 97% se produce desde principios de mayo hasta las últimas cosechas en principios de octubre. Esto indica claramente que el mercado que consume esa producción queda desabastecido en la temporada octubre-mayo, es decir cuando en Argentina las plantaciones alcanzan a producir. Un 70 % de la producción internacional de arándanos se consigue de plantíos silvestres, y el 30 % restante de plantaciones comerciales cultivadas. Más del 89 % de la producción se obtiene en los E.E.U.U. y Canadá, entre los que se destaca ampliamente el primero de ellos. En el hemisferio sur, recién en la década del 50, Nueva Zelanda comenzó a incursionar en este cultivo, y actualmente es el principal productor de este hemisferio. Luego le siguieron Chile, Sudáfrica, Australia y Argentina. En cuanto al cultivo de olivo, la producción nacional actual es de alrededor de 100.000 toneladas anuales de aceituna, de las cuales el 38% aproximadamente se destinan a la elaboración de aceitunas de mesa (38.000 toneladas anuales que equivalen al 4% de la producción mundial) y el 62 % restante a la producción de aceite de oliva (14.000 toneladas que implican el 0.62% de la producción mundial) (Matias, C. 2002).

Numerosos agentes patógenos afectan a cultivos no convencionales en Argentina como lo son arándanos (Hongn *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2004; 2005; 2006) y olivos (Barrera *et al.*,

2003; Barreto *et al.*, 2003; Docampo *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2001; 2004a,b,c), ocasionando graves pérdidas de producción. Dentro de los principales agentes patógenos que ocasionan pérdidas en la producción de olivo cabe citarse a *Verticillium dahliae*, un hongo de suelo que se caracteriza por producir conidias sobre conidióforos verticilados, y unas estructuras multicelulares denominadas microesclerocios. Como principales agentes patógenos de arándano pueden citarse a *Alternaria tenuisima* (Wright *et al.*, 2004), *Fusarium* sp. el cual se aisló de las localidades de Baradero, La Plata, Lima, Mercedes, Pilar, Zarate y Concordia. Es un microorganismo del suelo asociado a crecimiento reducido, escaso desarrollo de raíces, marchitamiento y muerte de plantas. La patogenicidad de *Fusarium solani* fue evaluada en plantines de Sharp Blue y Georgia Gem con resultados positivos (Wright *et al.* 2004). *Fusicoccum aesculi* causante del síndrome de rama seca del arándano (Hongn *et al.*, 2004) y *Botrytis cinerea* causante del moho gris en frutos constituyen también importantes patógenos de arándano y otros cultivos. Su principal forma de control ha sido mediante el uso de fungicidas del grupo de los benzimidazoles (benomilo), pero su utilización intensiva ha traído como consecuencia la aparición de resistencia (Pérez *et al.*, 2003).

Las rizobacterias que ejercen efectos benéficos promoviendo el crecimiento de las plantas, han sido denominadas PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper *et al.* 1991). Tal promoción del crecimiento involucra mecanismos de acción directa

y/o indirecta (Kloepper, Schroth, 1978). El control biológico se presenta como una alternativa eficaz y libre de riesgo frente a los numerosos y crecientes problemas derivados del uso de los productos químicos biocidas. El objetivo de esta investigación, es avanzar en el control biológico de la enfermedad "podrición de raíces" en cultivos de arándano, causada por una cepa del género *Fusarium*, mediante la utilización de microorganismos antagónicos, reduciendo la mortalidad de plantas y evitando la diseminación del patógeno a otros lugares.

Las cepas de *Bacillus* presentan algunas ventajas sobre otros géneros bacterianos propuestos como agentes de biocontrol ya que se encuentran frecuentemente en los aislamientos de suelo capaces de esporulación, son fáciles de cultivar, conservar y algunas cepas promueven el crecimiento de varios cultivos (Quan *et al.*, 2006).

En la presente investigación se buscó aislar bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con características PGPR, por lo cual se evaluó en cada uno de los aislamientos, la actividad antagonista de fitopatógenos, la producción y resistencia a antibióticos y la solubilización de fósforo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos

Se aisló y seleccionó un total de 15 bacilos termorresistentes de la rizósfera de una plantación de arándano (*Vaccinium corymbosum*) var. O' Neal, cultivado en un suelo Ultifultivo en Concordia (Entre Ríos) y de la rizósfera de una plantación de olivos (*Olea europaea*) de INTA-Castelar, de aproximadamente 60 años, la cual se encuentra en etapa de recuperación. Para ello se utilizó el método del shock térmico y se sembró en agar nutritivo, incubando a 30°C durante 72 horas (Lindquist, 2001).

Actividad antifúngica

Los bacilos seleccionados fueron sometidos a la prueba de antagonismo mediante el método dual de cultivo, estadísticamente estandarizado.

Se sembraron placas de TSA al 30 % con el hongo fitopatógeno *Fusarium* sp. Se incubaron durante 7 días a 28 °C. Así mismo, la cepa 46-12 se sembró en placas de TSA al 30% y se incubó 48 horas a 28°C. Durante toda la experiencia se trabajó a 28°C debido a que es la temperatura óptima de crecimiento de los hongos. Luego de los 7 días de crecimiento, los micelios fúngicos se guardaron en heladera durante 72 horas.

La bacteria (desarrollada en TSA al 30% luego de 48 h de incubación) se sembró en estrías sobre un tercio del medio. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28°C. Posteriormente, en el lado opuesto se sembró un disco fúngico (7 mm) obtenidos a partir del cultivo ya descrito con sacabocados. Las placas de biocontrol se incubaron a 28°C durante 72 horas.

La experiencia se realizó con N=30 por cada par bacteria-hongo evaluada, y el porcentaje de inhibición se calculó considerando la reducción del desarrollo micelial respecto a las placas de control fúngico sin inóculo bacteriano.

Solubilización de fosfatos

Para evaluar la capacidad solubilizadora de fosfatos de cada aislamiento, se utilizó la metodología de Kucey (1983). Se evaluó estadísticamente la formación de zonas claras o halos de disolución de los cristales de fosfatos alrededor de las colonias

Producción de antibióticos

Cada bacteria fue enfrentada a todas las demás bacterias, a los efectos de evaluar inhibición entre los aislamientos. La bacteria a analizar fue estriada en un tercio de la placa de agar nutritivo y el resto de las bacterias fueron estriadas en sentido perpendicular. Este ensayo se realizó con variación temporal de 0 y 24 h de inoculada la cepa problema, dando ventaja a la producción de un posible antibiótico. El segundo método que se empleó para determinar la producción de antibiótico fue un medio líquido 5 g/L glucosa, 1 g/L NH₄Cl, 0.8 g/L extracto de carne, 5 g/L MgCl₂, pH 6.0) a 33°C durante 40 h (Quan *et al.*, 2006).

Resistencia a antibióticos

Se evaluó la resistencia a antibióticos de los aislamientos en primera medida como prueba de diferenciación fenotípica y en segunda instancia, como una inferencia de la posible existencia de plásmidos, ya que generalmente en ellos se encuentran estos marcadores de importancia biotecnológica. El patrón de resistencia a antibióticos de cada uno de los cultivos se determinó a partir del estriado de las células bacterianas en los medios con antibiótico y su posterior incubación a 28 °C durante 72 h. Se probaron los siguientes antibióticos con las concentraciones que se detallan, eritromicina (50 µg/ml), estreptomycin (400 µg/ml), Neomicina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) y tetraciclina (50 µg/ml). Por ejemplo, el gen que confiere resistencia a eritromicina se ha observado en un megaplásmido de *B thuringiensis* subsp. *israelensis*. (Gammon *et al.*, 2006).

RESULTADOS

En el ensayo de biocontrol se observó que el crecimiento del hongo fue inhibido en un 60 % con respecto al control hongo por 4 de los aislamientos.

Las cepas bacterianas aisladas no mostraron capacidad solubilizadora de fosfato en los medios ensayados, pero sí mostraron producción de antibiótico.

El antibiograma que se presenta en la Tabla 1, mostró que los morfos 1, 2, 4, 8 y 15 son resistentes a tetraciclina (50 µg/ml). Mientras que mostraron resistencia frente a kanamicina (50 µg/ml) los morfos 8, 13 y 14. Los morfos 8 y 13 mostraron resistencia frente a neomicina (100 µg/ml) y solo el morfo 12 mostró resistencia a estreptomycin (400 µg/ml) mostrando débil resistencia los morfos 8 y 11. Los morfos 2, 6 y 7 fueron resistentes a eritromicina (50 µg/ml).

Tabla 1: Antibiograma de los 15 aislamientos

Morfo	Er/50	Tc/50	Km/50	Nm/100	Sm/400
1	S	R	S	S	S
2	R	R	S	S	S
3	S	S	S	S	S
4	S	R	S	S	S
5	S	S	S	S	S
6	R	S	S	S	S
7	R	S	S	S	S
8	S	R	R	R	R
9	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S
11	S	S	S	S	R
12	S	S	S	S	S
13	S	S	R	R	S
14	S	S	R	S	S
15	S	R	S	S	S

DISCUSIÓN

El presente trabajo muestra evidencias de que los morfos 2, 4, 8, y 12 fueron capaces de ejercer acción antagonista frente a *Fusarium* sp. Es importante evaluar en la próxima instancia si estos morfos son capaces de promover el crecimiento vegetal del arándano y/o olivo; ya que, tal como menciona Glick (1995), está generalmente aceptado que uno de los mecanismos más importantes, por el que las rizobacterias promueven el crecimiento vegetal, ocurre mediante la supresión de microorganismos patógenos más o menos importantes. También se ha sugerido que las rizobacterias pueden manifestar sus efectos promotores del crecimiento indirectamente, estimulando la acción beneficiosa de otros microorganismos asociados a las raíces, como las micorrizas. Cuando la estimulación del crecimiento vegetal se produce en ausencia de otros microorganismos, ésta se ha atribuido al incremento de la disponibilidad de nutrientes minerales, como el fosfato o el nitrógeno, debido a la producción de fitohormonas estimuladoras del crecimiento vegetal o a la degradación de precursores del etileno en la raíz por parte de estas bacterias.

Este grupo de investigación busca mejorar la sanidad y favorecer el crecimiento vegetal mediante el uso de microorganismos benéficos, enmiendas orgánicas y extractos vegetales, reduciendo la aplicación de plaguicidas químicos en un marco de manejo integrado y sustentable de los sistemas productivos agrícolas. Con el objeto de completar el estudio actualmente se está ensayando *in situ* la capacidad biocontroladora de los morfos analizados mediante ensayos de patogenicidad a fin de comprobar además, de que la especie fúngica analizada muestra actividad deletérea sobre arándano y olivo, evaluar. Posteriormente, el efecto

de un formulado en base a las cepas efectivas sobre la especie patógena y ambos cultivos. Por lo anteriormente expuesto se propone continuar con el estudio de las propiedades benéficas de las cuatro cepas seleccionadas como agentes biocontroladores, desde el mismo plan de trabajo con las técnicas ya estandarizadas, pero ampliando el espectro de los hongos patógenos que afectan a las plantaciones de arándano y olivo en Argentina.

REFERENCIAS

- Barrera, V.; Barreto, D.; Pérez, B.A.; Roca, M.; Naito, S.; Kobayashi, K. 2003. *Rhizoctonia* root rot of olive trees in Argentina. Page 88 In: VIII Internat. Congr. Plant Pathology. New Zeland.
- Barreto, D.; Babbitt, S., Gally, M. and Pérez, B.A. 2003. *Nectria haematococca* causing root rot in olive greenhouse plants. RIA 32(1):49-55.
- Docampo, D.M.; Oriolani, E.; Otero, L.; Pérez, B.A. 2006. Atlas de las enfermedades de olivo (*Olea europaea*) en Argentina. En: Atlas e índice de las enfermedades de las plantas cultivadas y nativas, explotadas de Argentina. Eds: Nome, S.F.; Docampo, D.M.; Laguna, I.G.
- Gammon, K.; Jones, G.W.; Hope, S.J.; De Oliveira, C.M.; Regis, L.; Silva Filha, M.H.; Dancer, B.N. 2006. Berry Conjugal transfer of a toxin-coding megaplasmid from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitocidal strains of *Bacillus sphaericus*. Appl. Environ. Microbiol. 72(3):1766-70.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41:109-117.
- Hongn, S.; Bains, O.; Ramallo, J.C. 2004. *Bptryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces. y De Not (*Fusicoccum aesculi corda*) causante del síndrome de rama muerta del arándano. Pág. 74. En: Actas. XII Jorn. Científicas Asoc. de Biología. Tucumán.
- Kloepper, J.W.; Schroth, M.N. 1978. Pages 379-382 In: Proceeding of the Fourth International Conf. on Plant Pathogenic Bacteria. Station de Pathologie Vegetale et Phytobacterologie, INRA, Angers (ed). Gibert-Clarey, Tours.
- Kloepper, J.W.; Zablotowicz, R. M.; Tipping, E.M.; Lifshitz, R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. Pages 315-326 In: The Rhizosphere and Plant Growth. DL Keister and PB Cregan (eds.) Kluwer Academic Publ. Dordrecht.
- Kucey, R.M.N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. Can. J. Soil Sci. 63:671-678.

Lindquist, M. 2001. Bacteriology. Dep. of Bacteriology. Ed. Univ. of Wisconsin. Madison. USA.

Matias, C. 2002. Programa Nacional de Investigación Frutales. Ed. INTA. Catamarca.

Pérez, B.A.; Barreto, D.; Docampo, D.; Otero, L.; Costilla, M.; Roca, M. and Babbitt, S. 2001. Current status of the drying syndrome (seca) of olive trees in Argentina. *Phytopathol.* 91(6, Suppl.):S71.

Pérez, B.A.; Barreto, D.; Maramorosch, K. 2004a. Hop and olive diseases. Pages 269-295 In: Chapter 8. Vol. IV: Diseases and disorders of fruits and vegetables. R. Dris, R. Niskanen, S.M. Jain, eds. Science Publishers, Inc. Enfield, USA. 333pp.

Pérez, B.A.; Oriolani, E.; Docampo, D.; Otero, L.; Matías, C.; Barreto, D. 2004b. Olive disease surveys in Argentina. *Phytopathol.* 94 (6), Suppl.

Pérez, B.A.; Oriolani, E.; Matías, C.; Brancher, N.; Barreto, D.; Docampo, D.; Otero, L.; La Rossa, R.; Saini, E.; Cap. G.; Martín, H.; Andre-Egg, A.; Bustos, J.; Buenos, L.; González, O.; Comerio, R. 2004c. Emergentes sanitarios en el área olivícola. Pag. 21 En: XXVII Cong. Argentino de Horticultura. San Luis.

Pérez, B.A.; Wright, E.R.; Fernández, R.; Ascitutto, K. 2005. Blueberry crown gall in Argentina. *Phytopathol.* 95:S82

Pérez, J.; Riegel, R.; Ciampi, L.; Barrera, S. 2003. Molecular detection of allele of resistance to benomyl in strains of *Botrytis cinerea* Pers., isolated from blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). XIII Cong. de Fitopatología. Chile.

Quan, C.; Wang, J.H.; Xu, H.T.; Fan, S.D. 2006. Identification and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* with high antifungal activity. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 46(1):7-12.

Wright, E.R.; Rivera, M.C.; Esperon, J.; Cheheid, A.; Rodríguez Codazzi, A. 2004. *Alternaria* leaf spot, twig blight and fruit rot of highbush blueberry in Argentina. *Plant Disease* 88:1383.

Wright, E.R.; Pérez, B.A.; Fernández, R.L.; Ascitutto, K.; Rivera, M.C.; Murillo, F.; Vásquez, P.; Divo de Sesar, M.; Pérez, A.; Aguilar Heredia, L.; Rosato, M.F.; Crelier, A.; Baldomá, J. 2005. Conocimiento actual sobre enfermedades de arándano. Pág. 113-117 En: 1er Congreso Latinoamericano de arándanos y otros berries. FAUBA. Bs. As.