

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE UN BIOPREPARADO A PARTIR DE UNA CEPA DE *Burkholderia cepacia* ANTE *Fusarium* sp EN EL CULTIVO DEL GLADIOLO (*Gladiolus* sp)

Yuselín Toledo[✉], Annia Hernández, Mayté Álvarez, Gloria M. Martín y Ramona Márquez

ABSTRACT. The antagonistic effect of a native strain of *Burkholderia cepacia* against the strains of *Fusarium* sp race 0 and race 1 was determined. Two *in vitro* experiments and one *in vivo* were developed in gladiolus. For the *in vivo* experiment, plastic pots with approximately 5 kg Red Ferralitic soil from “Las Papas” Experimental Station were used. Healthy and *Fusarium*-infected white bulbs were used. In the *in vitro* experiments, an inhibition of 48 to 73.68 % *Fusarium* (sp) race 0 and of 43.18 to 50.07 % race 1 was demonstrated. In the *in vivo* experiment, the 90 % of fungal growth was controlled, it proving at the same time plant growth stimulation in gladiolus.

Key words: *Gladiolus*, *Burkholderia cepacia*, *Fusarium*, biological control, antagonism

RESUMEN. Se determinó el efecto antagónico de una cepa nativa de *Burkholderia cepacia* ante una cepa de *Fusarium* sp raza 0 y raza 1. Para ello se desarrollaron dos experimentos *in vitro* y uno *in vivo* en el cultivo del gladiolo. Para el experimento *in vivo* se utilizaron macetas plásticas con aproximadamente 5 kg de suelo Ferralítico Rojo procedente de la Estación Experimental “Las Papas”. Se utilizaron bulbos blancos sanos e infectados de forma natural con *Fusarium*. En los experimentos *in vitro* se demostró una inhibición del 48 al 73.68 % del crecimiento de la cepa de *Fusarium* sp raza 0 y del 43.18 al 50.07 de la raza 1. En el experimento *in vivo* se logró biocontrolar el 90 % del crecimiento del hongo, demostrándose al mismo tiempo además la actividad estimuladora del crecimiento vegetal del biopreparado sobre el cultivo del gladiolo.

Palabras clave: *Gladiolus*, *Burkholderia cepacia*, *Fusarium*, control biológico, antagonismo

INTRODUCCIÓN

La elaboración de productos naturales como alternativa a los quimiotoxicos, que además de ser altamente contaminantes y peligrosos a la salud resultan caros, es esencial en países subdesarrollados. Trabajar con biopreparados formados por metabolitos activos de origen bacteriano, sin incluir la célula como tal, brinda magníficas posibilidades para su utilización como estimulador del crecimiento vegetal y/o agente de biocontrol, una vez que se aseguren las condiciones de formulación del producto (1).

La aplicación de microorganismos rizosféricos en la agricultura es una práctica que internacionalmente ha tomado auge en los últimos años. *Burkholderia cepacia* se describe como una bacteria muy atractiva y de considerable atención por su gran diversidad genética, apareciendo como patógeno de plantas, saprofito,

biorremediador, estimulador del crecimiento vegetal y agente de biocontrol en diferentes cultivos de interés agrícola (2). Entre sus mecanismos de acción se destacan el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la producción de fitohormonas y el biocontrol de patógenos. En ese sentido, trabajar con cepas autóctonas y obtener productos en ausencia de la célula aumenta su factibilidad desde el punto de vista ecológico.

El gladiolo es atacado por *Fusarium oxysporum*, patógeno que causa grandes pérdidas anuales a los productores de flores. La infección en un principio se origina en el campo, ya que el hongo puede permanecer en el suelo hasta seis años. El ataque se establece a través de las heridas o por las propias raíces en el cormo viejo y de este pasa al nuevo (3).

Este trabajo tiene como objetivo determinar el efecto biocontrolador de *Burkholderia cepacia* ante *Fusarium* sp en el cultivo del gladiolo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplimentar estos objetivos se tomó una cepa nativa de *Burkholderia cepacia*, aislada de la rizosfera del cultivo del maíz, procedente del cepario de rizobacterias del INCA y se ejecutaron dos experimento *in vitro* y uno *in vivo*.

Yuselín Toledo, Reserva Científica; Ms.C. Annia Hernández y Ms.C. Mayté Álvarez, Investigadores Agregados; Ms.C. Gloria M. Martín, Investigadora y Ramona Márquez, Especialista del departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

✉ ytoledo@inca.edu.cu

Experimentos in vitro

Ensayo in vitro no. 1. Se inocularon 100 µL de la cepa de *B. cepacia* en estudio en el centro de las placas que contenían Medio Papa Dextrosa Agar (PDA) (BIOCEN) y se diseminó con espátula de Drigalski. Se incubó a 37°C durante 72 horas.

Las cepas de *Fusarium* sp., raza 1 y raza 0, procedentes del cepario de hongos fitopatógenos de la "Liliana Dimitrova" (IIH), se utilizaron para obtener una suspensión de esporas que se colocaron por separado en pocillos ubicados en las placas de PDA, previamente sembradas con la bacteria. El porcentaje de inhibición se determinó después de siete días de crecimiento del hongo a 28°C.

Ensayo in vitro no. 2. Este experimento se realizó para determinar el efecto inhibitorio de los metabolitos activos, producidos por *B. cepacia* contra las razas del hongo fitopatógeno en estudio. Para ello se mantuvieron las mismas condiciones de inoculación e incubación de la bacteria; posteriormente, las placas que contenían dicha cepa se expusieron a vapores de cloroformo durante 15 minutos con el objetivo de eliminarla.

Seguidamente las cepas de *Fusarium* sp., raza 1 y raza 0, se inocularon en el centro de la placa de PDA y se incubaron durante siete días a 28°C. El efecto antagónico de la bacteria e inhibitorio de los metabolitos producidos por ella se determinó mediante el diámetro de crecimiento del hongo; con dichos datos se calculó el porcentaje de inhibición (4). En ambos ensayos se estableció un tratamiento control con las razas de la cepa de *Fusarium* sp en estudio y se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.

Experimento in vivo

Características del suelo y variables climáticas. El experimento se ejecutó en el área central del INCA, en el período de octubre-diciembre de 1999. Para ello se emplearon macetas plásticas que contenían tres bulbos de gladiolo y aproximadamente 5 kg de suelo Ferralítico Rojo procedente de la Estación Experimental "Las Papas", a los cuales se les determinaron algunas propiedades químicas en el Laboratorio de Análisis Químico del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas (INCA). Se determinaron el pH-H₂O (método potenciométrico), la materia orgánica (%) (Walkley-Black), P (ppm) (Oniani), Ca²⁺, K⁺ y Mg²⁺ intercambiables (cmol.kg⁻¹) (Maslova) (5). En la Tabla I se muestran las características químicas iniciales del suelo utilizado.

Tabla I. Características químicas del suelo

Tipo de suelo	K	Ca ²⁺ (cmol.kg ⁻¹)	Mg ²⁺	P (ppm)	MO (%)	PH (H ₂ O)
Ferralítico Rojo	0.76	15.5	4.07	175.4	3.70	7.38

El suelo estudiado, de pH neutro, tiene un contenido medio de materia orgánica, está altamente fosfatado y posee un alto contenido de Mg y K y medio de Ca. Las variables climáticas se describen en la Tabla II.

Tabla II. Variables climáticas

Meses del año	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)	Humedad relativa (%)
Experimento 1			
Octubre	25.40	127.0	84.00
Noviembre	23.60	79.7	84.00
Diciembre	20.90	11.7	79.00
Promedio histórico	23.6	226.88	80-85

Material vegetal. Se utilizaron bulbos de gladiolos blancos, de tamaño homogéneo, sanos e infectados de forma natural con *Fusarium* sp. Estos fueron previamente incubados en refrigeración durante tres meses.

Inoculación. Se utilizó un biopreparado sólido formado por un inoculante líquido a base de metabolitos activos de la cepa de *B. cepacia*, inmovilizado en turba molida tamizada estéril. Como método de inoculación se utilizó el recubrimiento de semillas (6).

Se establecieron los siguientes tratamientos:

T1- Control (semillas sanas)

T2- Control (semillas infectadas)

T3- Semillas sanas más biopreparado

T4- Semillas infectadas más biopreparado.

Determinaciones. Se determinaron la germinación (tres períodos de emergencia), altura de las plantas (cm), el tamaño de la espiga (cm), número de flores y cormos por planta.

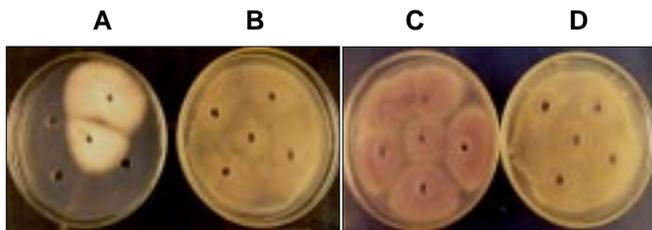
Análisis estadístico. El experimento se repitió dos veces. Se establecieron 15 observaciones por tratamiento. Los datos fueron procesados según un diseño completamente aleatorizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento in vitro. En la Figura 1 se muestra el efecto antagónico de la cepa bacteriana estudiada frente a las dos razas del hongo fitopatógeno *Fusarium* sp. Se observó que frente a *Fusarium* sp raza 1, la acción de *B. cepacia* produjo un 50.07 % de inhibición del crecimiento del hongo y por su parte para la raza 0 se produjo un 48 % de inhibición.

Diversos autores han informado la efectividad de aplicar cepas de *Pseudomonas* sp como agentes de biocontrol (7, 8). Se ha demostrado el efecto antagónico de *Pseudomonas* sp PPS y PS11 ante diferentes hongos fitopatógenos; en dichos experimentos se observó que la cepa PS11 provocó un 60 % de inhibición de *Sclerotium rolfsii* y la PPS un 25 % del crecimiento micelial de este hongo (9).

Asimismo se demostró que cuando se aplican cepas de *Pseudomonas fluorescens* PF1 y PF7 al cultivo del arroz, se logran reducir los síntomas provocados por *R. solani* (10). Resultados similares fueron encontrados en caña de azúcar contra *Colletotrichum falcatum* (11).



Fusarium sp raza 1: control (A), antagonismo (B)
Fusarium sp raza 0: control (C), antagonismo (D)

Figura 1. Efecto antagonístico de *B. cepacia* ante *Fusarium* sp

En esta investigación se evidencia que los metabolitos activos producidos por *B. cepacia* inhiben el crecimiento de las dos cepas de *Fusarium* sp estudiadas (Figura 2). Al eliminar la bacteria y enfrentar el biopreparado que contiene los metabolitos segregados por esta durante su desarrollo, se sigue manifestando un efecto limitante para los hongos fitopatógenos empleados en este estudio. Consideramos que este efecto pueda deberse fundamentalmente a la existencia de sustancias antifúngicas y sideróforos en el biopreparado; ambas sustancias se producen en la fase estacionaria del crecimiento y su acción es independiente de la presencia de la célula bacteriana.

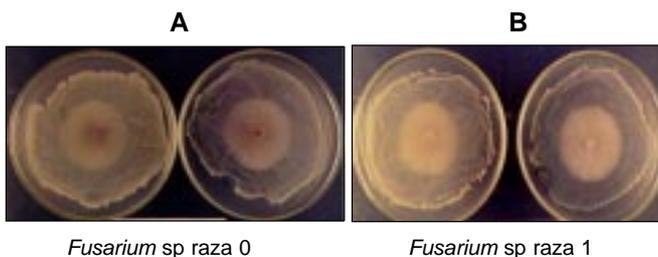


Figura 2. Efecto inhibitorio de los metabolitos de *B. cepacia* ante *Fusarium* sp

Diversos estudios han demostrado la producción de sideróforos por cepas de *B. cepacia*, las cuales fueron crecidas en los medios King B y Sirope Fructosa (12). Por su parte, algunos autores demostraron la presencia de alcaloides quinolisidínicos, de naturaleza antibiótica, en cultivos de cepas microbianas de este mismo género (13).

El inóculo demostró un 73.68 % de inhibición para la raza 0 y un 43.18 % para la raza 1. Estos resultados demuestran que para el caso de *B. cepacia*, los metabolitos desempeñan un papel rector en el biocontrol, cuestión que permitiría trabajar con un biopreparado con los metabolitos activos en ausencia de la célula, lo que aumentaría su factibilidad desde el punto de vista ecológico.

Se ha informado la efectividad de biopreparados, obtenidos a partir de metabolitos activos de origen bacteriano en el biocontrol. Tal es el caso de la aplicación de antagonistas bacterianos para el control del damping off en maíz causado por especies de *Phytophthora* y *Fusarium* (14).

Se han demostrado los efectos benéficos de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2, en la promoción del crecimiento de las plantas y en el biocontrol de *Botrytis cinerea* en frijol. Los autores no obtuvieron respuestas similares al trabajar con la cepa 7NSK2-562, mutante en la producción de ácido salicílico y piochelin (15). Estos resultados demuestran una vez más el papel que desempeñan los metabolitos activos y especialmente los sideróforos en la actividad del biocontrol.

A pesar de que muchos estudios han utilizados los ensayos en agar para determinar la inhibición de patógenos inducida por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, esta práctica es controversial. El ensayo en Agar aunque sencillo de realizar presenta la desventaja de no contar con la planta, lo cual puede ser determinante para la supervivencia, colonización y actividad inhibitoria de la bacteria hacia el hongo patógeno (16).

Experimento in vivo. Los resultados obtenidos demuestran un efecto bioestimulador y biocontrolador del biopreparado en estudio en el cultivo del gladiolo para las condiciones evaluadas.

En cuanto a la germinación, se puede observar que las semillas inoculadas con el biopreparado en estudio, tanto sanas como infectadas, logran salir del periodo de dormancia primero que el control sin inocular (Tabla III). En el caso del control con semillas infectadas, solo logra germinar el 6.66 %, pereciendo al cabo de los 10 días. Resultados similares fueron encontrados por otros autores en el cultivo del gladiolo al detectarse la afectación del proceso de germinación, lo que conlleva a la obtención de plantas débiles y amarillentas al principio del cultivo, las cuales se van pudriendo por la base del tallo hasta perecer (3).

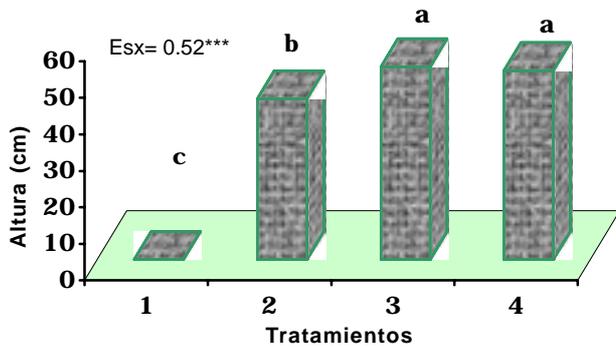
Tabla III. Efecto sobre la germinación

Tratamientos	Períodos de emergencia		
	1ro.	2do.	3ro.
T1	-	-	100 %
T2	-	-	6.66 %
T3	100 %	-	-
T4	100 %	-	-

Las condiciones climáticas no ejercieron un efecto marcado sobre el desarrollo del hongo, ya que los datos informados para el período en que se desarrollaron los experimentos se comportaron dentro de la media histórica para la zona.

Se ha demostrado el efecto bioestimulador de este biopreparado sobre otros parámetros fisiológicos del cultivo, como es el caso de la altura (Figura 3).

Incrementos en el crecimiento de las plantas fueron encontrados por diversos autores al inocular la cepa de *Burkholderia cepacia* MC17 en el cultivo del maíz. En este experimento también se demostró el efecto biocontrolador de dicha cepa ante *Fusarium moniliforme* en este cultivo (8).



En este experimento se manifestó una relación directa entre la altura y las variables tamaño de la espiga, número de flores y cormos por planta para cada tratamiento (Figura 4). En todos los casos se destacan los tratamientos donde se aplicó el biopreparado, no mostrándose diferencias significativas entre semillas sanas e infectadas para un $p < 0.001$. Estos resultados se corresponden con los obtenidos en el cultivo de la papa, utilizando productos de origen bacteriano y semillas sanas e infectadas con *Phytophthora infestans* (17).

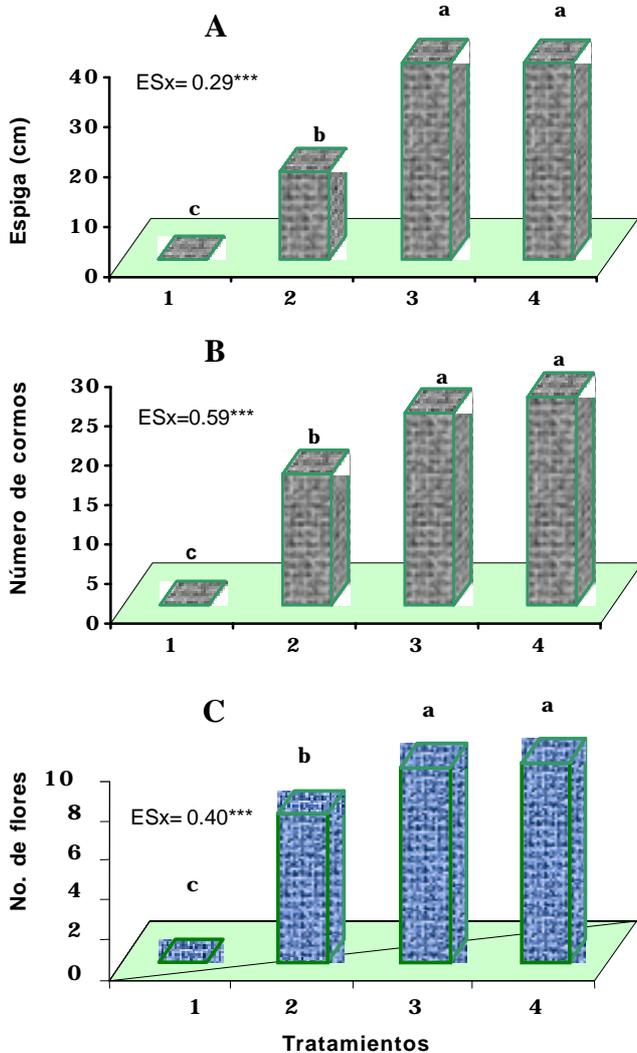


Figura 4. Tamaño de la espiga (A), número de cormos (B) y número de flores por planta (C)

Los experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los sideróforos desempeñan un importante papel en el biocontrol de diferentes hongos fitopatógenos que atacan a cultivos de interés económico. Los resultados obtenidos en este experimento demuestran el efecto biocontrolador del biopreparado estudiado, que incluye sideróforos ante *Fusarium* sp.

En el experimento *in vivo* se logra controlar el 90 % del hongo, cuestión que no ocurre en el experimento *in vitro*. Esto podría deberse a que en la interacción planta-bacteria, el producto bacteriano logra inducir resistencia a la planta y con ello prepararla para el ataque del patógeno.

En esta investigación se demostró la efectividad de aplicar biopreparados a partir de metabolitos activos producidos por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal pertenecientes a *B. cepacia* en la estimulación del crecimiento y como agente de biocontrol en el cultivo del gladiolo.

REFERENCIAS

- Ortiz, S. Estudio de las condiciones de crecimiento de *Burkholderia cepacia* 0057 para la producción de sideróforos. [Tesis de Maestría], Instituto de Farmacia y Alimento. Universidad de La Habana. 2001. 66 p.
- Govan, J. /et al./ *Burkholderia cepacia*-Friend and Foe. ASM News, 2000, vol. 66, no.3, p. 124-125.
- Badriati, D. S. y Sanjaya, L. Research results of gladiolus during 1993/1994 and 1994/1995. En: Proceedings of a meeting on evaluation of research results in horticulture. 1995, t. 6, p. 20-30.
- Bashan, Y.; Holguin, G. y Ferrera-Cerrato, R. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Azospirillum*. 1996, vol. 14, no. 2, p. 159-193.
- Paneque, V. M. /et al./ Manual de técnicas analíticas para suelo, foliar y fertilizantes químicos. La Habana : INCA, 2000.
- Gómez, R. /et al./ Principales resultados en la aplicación de biofertilizantes en cultivos de interés económico para Cuba utilizando la tecnología de recubrimiento de semillas. En: Programa y Resúmenes del Seminario Científico. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. (11:1996:La Habana), 1996.
- Picard, C. /et al./ Frequency and biodiversity of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, vol. 66, no. 3, p. 948-955.
- Bevivino, A. /et al./ Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biology and Fertility of Soils*, 2000, vol. 31, no. 3-4, p. 225-231.
- Fernández, Y. Evaluación de diferentes medios para la producción de metabolitos secundarios a partir de dos cepas de *Pseudomonas* sp. [Trabajo de diploma], Universidad de La Habana. 1998. 51 p.
- Ramamoorthy, V. /et al./ Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop protection*, 2001, vol. 20, no. 1, p. 1-11.

11. Viswanathan, R. y Samiyappan, R. Antifungal activity of chitinase produced by some fluorescent pseudomonas against *Colletotrichum falcatum* when causing red rot disease in sugarcane. *Microbiological Research*, 2000, vol. 155, p. 1-6.
12. Velázquez, E. /et al./ Estudio de la interacción maíz-*Burkholderia cepacia*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, 1999, vol. 41, no.1, p. 17-25.
13. Surk-Sik, Mon /et al./ Synthesis of plant growth promoting and fungicidal 4-quinolinone metabolites of *Pseudomonas cepacia*. *Bull. Korean Chem. Soc.* 1995, vol. 16, p. 1128-1130.
14. Mao, W. /et al./ Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist forb reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. *Biocontrol of Plant Diseases Laboratory*, 1997, vol. 81, no. 5, p. 450-454.
15. De Meyer, G. y Hofte, M. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on Bean. *Biological Control*, 1997, vol. 87, no. 6, p. 588-593.
16. Holguín, G. /et al./ Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos: III. Procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrizicos y rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas. 1996, vol. 4, no.2, p. 212-227.
17. Miranda, S.; Hernández, A y Marqués, R. Estudio del efecto antagónico de productos bacterianos ante *Phytophthora infestans*. En: Programa y Resúmenes Seminario Científico. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. (12:2000:La Habana), 2000.

Recibido: 17 de diciembre del 2001

Aceptado: 17 de junio del 2002

DIPLOMADOS

Precio: 500 USD

Uso y manejo de los biofertilizantes

Coordinador: Dr.C. Nicolás Medina Basso

Duración: 1 año



SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu