

CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES MEDIANTE EL TRATAMIENTO DE SEMILLAS DE CUCURBITÁCEAS CON RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS (PGPR).AUTORES: Gilda Jiménez Montejo ¹Jesús Mena Campos ²Yamilka Ramírez Núñez ³

DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA: gjimenez@ucp.cm.rimed.cu

Fecha de recibido: 18 de septiembre de 2013

Fecha de aceptado: 14 de noviembre de 2013

RESUMEN

Las regulaciones sobre la producción de alimentos sanos limitan actualmente el uso de fungicidas sintéticos para el tratamiento de semillas y, por otra parte, no se dispone de bactericidas efectivos. Se condujeron experimentos en condiciones controladas para evaluar el efecto de las cepas de rizobacterias antagonistas *Bacillus subtilis* F16/95, *B. subtilis* Xph y *Pseudomonas putida* 14A en el control biológico de la Mancha bacteriana de las cucurbitáceas, la Mancha bacteriana del fruto de melón y la pudrición de la raíz, provocadas por *Xanthomonas cucurbitae*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente. Se realizó el tratamiento de semillas de pepino (*C. sativus*, L.) var. Poinsett, calabaza (*Cucurbita moschata*, Duch.) var. INIVIT C-88, y melón de Castilla (*Cucumis melo*, L.) var. Hale's Best. Los tratamientos biológicos mostraron una reducción en la incidencia de las enfermedades e incrementos de longitud del tallo y peso fresco de hojas y raíces, en todas las interacciones planta-patógeno-antagonista. La colonización de raíces alcanzó rangos de 8,9-8,0 y 7,8-7,0 log (ufc cm⁻¹ de raíz) a los 4 y 15 días después de la siembra. Estos resultados caracterizaron las cepas aplicadas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y aconsejan la realización de ensayos de campo.

PALABRAS CLAVE/ rizobacterias, control biológico, enfermedades, semillas, cucurbitáceas.

¹ Ing. Agrónoma, M. Sc en Ciencias Agrícolas, Profesora auxiliar, Universidad de Ciencias Pedagógicas "José Martí" de Camagüey

² Dr. Ciencias Biológicas, Investigador, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey

³ Lic. en Farmacia, M. Sc., Investigadora, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey

BIOLOGICAL CONTROL OF DISEASES BY CUCURBITS SEEDS TREATMENT WITH RHIZOBACTERIA PLANT GROWTH PROMOTING (PGPR).

ABSTRACT

Nowadays the regulations about the production of healthy foods limit the use of synthetic fungicides for seeds treatment and, on the other hand, effective bactericides are not available. Experiments under controlled conditions were conducted to evaluate the effect of rhizobacterial antagonistic strains *Bacillus subtilis* F16/95, *B. subtilis* Xph and *Pseudomonas putida* 14A on the biological control of Cucurbits bacterial spot, Watermelon bacterial fruit blotch and Fusarium root rot caused by *Xanthomonas cucurbitae*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Fusarium oxysporum*, respectively. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) var. Poinsett and pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) var. INIVIT C-88 and melon (*Cucumis melo* L.) var. Hale's Best seeds were treated. The biological treatment showed decreasing diseases incidence and increasing root and leaves weighs and stem height, in the plant-pathogen-antagonist interactions tested; root colonization reached a range from 8,9- 8,0 and from 7,8-7, 0 log (ufc cm⁻¹ root) at 4 and 15 days after sowing. These results characterize the applied strains as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and make advisable the development of field trials.

KEYWORDS / rhizobacteria, biological control, diseases, seed, cucurbits

INTRODUCCIÓN

Las plantas de la familia *Cucurbitaceae* se agrupan en más de un centenar de géneros, de los cuales tienen importancia económica para la horticultura los géneros *Cucumis*, *Citrullus* y *Cucurbita*. Algunas especies de hongos y bacterias que causan enfermedades en las cucurbitáceas son transmisibles por la semilla y por el suelo. Estas enfermedades ocasionan el deterioro de la semilla y síntomas en las plántulas en la etapa de germinación y brotación; posteriormente hojas y frutos pueden ser infectados (Zitter y col., 1996).

El interés que despierta el control de las enfermedades que afectan económicamente los cultivos de las cucurbitáceas está estrechamente relacionado con el importante papel que estas hortalizas desempeñan en la alimentación humana, sobre todo en las regiones tropicales donde el consumo es muy elevado debido a sus cualidades digestivas y refrescantes. Además, el melón de Castilla tiene alta demanda en el comercio internacional.

Por otra parte la tecnología de producción de semillas requiere más tiempo de permanencia de los cultivos en el campo durante la maduración de la simiente,

en comparación con los cultivos cosechados para el consumo, de manera que las plantas tienen mayor tiempo de exposición al ataque por insectos y enfermedades.

Consecuentemente con este requisito, el método de exclusión de agentes patógenos mediante el tratamiento de semillas o material de siembra (Zadok y Schein citados por Altieri, 1997) se incluye entre los métodos generales para el control de enfermedades de las plantas y sus efectos epidemiológicos.

En la actualidad el tratamiento de semillas mediante el uso de fungicidas del grupo etil-bis-ditiocarbamato como Thiram o TMTD está restringido en muchos países, debido a la amenaza ambiental creciente que plantea la contaminación del suelo y las aguas subterráneas con pesticidas en muchas áreas agrícolas.

Aunque se ha ensayado el tratamiento químico de semillas de calabaza (Moffett y Wood, 1979; Lyon y Riedel, 2003) y de melón (Larson y col., 1999), no se dispone de bactericidas efectivos. Se considera que la prevención de estas enfermedades radica en la utilización de semillas libres de bacterias fitopatógenas (Babadoost, 2002; Hopkins y Thompson, 2000).

Por otra parte, la sobrevivencia durante largo tiempo en el suelo y la evolución de nuevas razas del hongo fitopatógeno hacen difícil el manejo de la marchitez por *Fusarium*, la enfermedad del melón más importante económicamente en todo el mundo (Egel y Martyn, 2007).

En correspondencia con las regulaciones orientadas hacia la producción de alimentos sanos, en Cuba la investigación se ha encaminado a la búsqueda de alternativas al uso de fungicidas. Se enfatiza en la búsqueda de aquellas que proporcionen protección a semillas y plántulas de cucurbitáceas de las infecciones provocadas por bacterias y hongos fitopatógenos.

La alternativa del tratamiento biológico de semillas se presenta con el aprovechamiento del potencial de algunas bacterias conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (*PGPR* por sus siglas en inglés). Además de promover el crecimiento de las plantas, las protegen contra agentes tales como bacterias y hongos fitopatógenos por su efecto antagónico frente a estos microorganismos (Kloepper y Schroth, 1978; Compant y col., 2005)

El aislamiento de cepas de rizobacterias que mostraron antagonismo *in vitro* frente a algunos agentes patógenos para los cultivos de cucurbitáceas, indujo a la realización de esta investigación con el objetivo de evaluar el efecto de las cepas de rizobacterias antagonistas *Bacillus subtilis* F16/95, *Bacillus subtilis* Xph y *Pseudomonas putida* 14A en el control biológico de la Mancha bacteriana de las cucurbitáceas, la Mancha bacteriana del fruto de melón y la pudrición de la raíz provocadas por *Xanthomonas cucurbitae*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo de inoculación artificial de semillas de pepino y melón de Castilla

Las semillas categoría certificada de pepino var. Poinsett y melón var Hale's Best se inocularon con las cepas *Xanthomonas cucurbitae* 1408/00 y *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* 672/01, respectivamente, mediante inmersión en las suspensiones durante 15 minutos e infiltración al vacío; se dejaron secar sobre papel de filtro en placas de Petri estériles.

Preparación del inóculo de *Fusarium oxysporum*

La cepa del hongo *Fusarium oxysporum* se transfirió al medio Agar Papa Dextrosa (PDA) para comprobar su pureza. La suspensión de esporas se preparó mediante la técnica de dilución en tubo con agua destilada estéril conteniendo Tween 80 al 0.2%, y conteo mediante la cámara de Neubauer a una concentración de 10^8 esporas ml^{-1} . La suspensión de esporas del hongo fitopatógeno se añadió a razón de 1ml en 0,6 g de hojas, tallos y raíces de pepino, previamente esterilizados en solución de hipoclorito de sodio 1,2 % durante tres minutos, lavados tres veces con agua destilada estéril y secados en papel de filtro. El inóculo así preparado se conservó en frascos estériles y se incorporó al suelo hasta 3 cm de profundidad a razón de 0,6 g por maceta antes de la siembra (Sandys-Winsch y col., 1994).

Preparación de los inoculantes bacterianos antagonísticos

Las antagonistas conservadas en el cepario se transfirieron al medio de cultivo Agar Nutritivo (AN) y se incubaron a 28 °C durante 24 horas. A partir de las colonias aisladas se inocularon cultivos en 5 ml de Caldo Nutritivo (CN) y se incubaron en cultivo agitado a 28 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia (λ 530 nm) y se calculó la dilución necesaria para lograr una absorbancia inicial de 0,1 en un volumen de 50 ml de medio. Se realizó la inoculación en medio CN contenido en frascos Erlenmeyers de 250 mL, se incubó en zaranda ajustada a 28 °C y a una velocidad de agitación de 250 r.p.m. durante 10 horas. Se comprobó la concentración de 10^8 ufc ml^{-1} de la suspensión bacteriana mediante el método de conteo en placa

Tratamientos de semillas

Las semillas de melón y de pepino inoculadas con las bacterias fitopatógenas, semillas de calabaza var. INIVIT C88 con infección natural por *Xanthomonas cucurbitae*, y las semillas de melón destinadas al ensayo frente a *Fusarium oxysporum*, se remojaron en el inóculo de las cepas antagonistas durante 5 minutos con agitación en zaranda de desplazamiento horizontal y se escurrieron sobre papel de filtro.

Se incluyeron los tratamientos a) cepa A-34 del hongo antagonista *Trichoderma harzianum* en semillas de melón de Castilla como control positivo frente a *F. oxysporum*, y b) tratamiento químico de semillas de calabaza infectadas por *X. cucurbitae* con solución de ácido clorhídrico diluido 1/20 a la cual se añadió adherente al 1% (Moffett y Wood, 1979).

Diseño del experimento

Los experimentos se desarrollaron en macetas colocadas bajo cubierta en el exterior, en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey durante la época de frío en tres años consecutivos.

Las macetas de 1 litro de capacidad se llenaron con una mezcla de suelo pardo mullido carbonatado, esterilizado en autoclave a 121 °C durante 1 hora y humus de lombriz pasterizado, en proporción 4:1. Las semillas se sembraron a razón de dos semillas por nido, cuatro nidos por maceta, a una profundidad de 3 cm. El sustrato en macetas se humedeció levemente antes de la siembra. Se realizó el raleo de plántulas una vez completada la brotación.

Se empleó un diseño de bloques al azar considerando los tratamientos con las cepas bacterianas antagonistas y los controles consistentes en semillas infectadas y semillas sin infección; el suelo inoculado artificialmente con el hongo *F. oxysporum* y suelo no infectado. Cada tratamiento constó de cuatro plantas por maceta, cinco macetas por tratamiento y los experimentos se repitieron tres veces.

Evaluación del tratamiento de semillas con las rizobacterias antagonistas

Se realizó el examen de las hojas cotiledonales para la observación de síntomas de las enfermedades bacterianas. Las raíces de las plántulas de melón de Castilla que presentaron colapso o marchitamiento se examinaron a partir de los 7 días hasta los 15 días posteriores a la siembra para determinar la presencia de síntomas de pudrición de la raíz provocada por *F. oxysporum*.

Se analizó el efecto de los tratamientos sobre las enfermedades ensayadas. Se aplicó la prueba no paramétrica de frecuencia con el estadígrafo χ^2 mediante la tabla de contingencia, al comparar la aparición de plantas sanas y enfermas entre los tratamientos y el testigo inoculado con el patógeno.

Evaluación del efecto de las rizobacterias antagonistas sobre el crecimiento de las plantas

El efecto de estimulación del crecimiento de las plantas por las rizobacterias antagonistas fue evaluado tomando al azar 10 plantas en tres repeticiones por cada tratamiento y del control de semillas sanas sin tratamiento para determinar la longitud del tallo, peso fresco de hojas cotiledonales y de raíces. Las variables de crecimiento se sometieron al análisis de varianza. Las medias de los tratamientos y de los testigos sanos se compararon mediante la prueba de Tukey. Se aplicó el paquete estadístico SPSS versión 11.5

Evaluación de la colonización de raíces por las rizobacterias antagonistas

La colonización de raíces por las rizobacterias se evaluó a partir del recobrado en los medios de cultivo Agar Nutritivo y B de King de las suspensiones bacterianas preparadas a partir de segmentos lineales de la parte superior de tres raíces por tratamiento de pepino y de melón de Castilla, a los cuatro y 15 días después de la siembra (Beauchamp y Kloepper, 2003). Los controles se sembraron en ambos medios.

El conteo de colonias se realizó a las 48 horas de incubación a 28 °C y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por cm de raíz a

partir de la fórmula: $C = X \cdot D \cdot 100$ ufc/ml, donde: X: media del conteo de las placas, D: factor de dilución = 1/dilución y 100: factor de conversión de μl a ml. La variable colonización de raíces (transformación de potencia de las densidades de población en logaritmo) por cada tratamiento se sometió al análisis de varianza. Las medias de los tratamientos y de los testigos sanos se compararon mediante la Prueba de Tukey. Se aplicó el paquete estadístico SPSS versión 11.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de inoculación artificial de semillas de pepino y melón de Castilla

La técnica de infiltración al vacío aplicada en este ensayo para la inoculación de las bacterias fitopatógenas no afectó la germinación, que alcanzó valores de 90% y 93% similares a los certificados inicialmente para los lotes de semillas de pepino (*C. sativus*) y melón de Castilla (*C. melo*), respectivamente. La emergencia de plántulas vigorosas transcurrió entre 3-4 días para el pepino y 5-6 días para el melón de Castilla.

La aplicación de la técnica de infiltración al vacío evitó la exposición de las semillas de cucurbitáceas al humedecimiento excesivo, como se indica en los ensayos de semillas de estas especies para no afectar la germinación y el vigor germinativo (ISTA, 1976), y el requerimiento de un menor tiempo para la imbibición previa a la germinación (Guenkov, 1969) en comparación con otras especies.

Además, la infección por *Xanthomonas cucurbitae* cepa 1408/00 y por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* cepa 672/01 en plántulas de pepino y de melón de Castilla, respectivamente, alcanzó valores cercanos a los casos de infecciones naturales. El síntoma de la Mancha bacteriana de las cucurbitáceas se observó en 78% de las plántulas de pepino var. Poinsett a partir de los 7 días posteriores a la germinación, valor cercano al de 80% informado mediante el análisis fitopatológico de semillas con infección natural. El síntoma de la Mancha bacteriana del fruto de melón se manifestó en las hojas cotiledonales de 76% de las plántulas de melón de Castilla var. Hale's Best a partir de los 9 días posteriores a la germinación, un valor próximo al 75% debido a la infección natural por *A. avenae* subsp. *citrulli* (Muñoz y Monterroso, 2002).

A los efectos del desarrollo de síntomas y los niveles de infección de ambas enfermedades, los resultados obtenidos en el ensayo de inoculación mediante infiltración al vacío justifican la aplicación de esta técnica.

Tratamiento de semillas con las rizobacterias antagonistas

El tratamiento biológico de semillas de pepino var. Poinsett y de melón de Castilla var. Hale's Best resultó efectivo para reducir la incidencia de las enfermedades bacterianas blanco de los experimentos (Tabla 1), y el efecto no mostró diferencias significativas entre las tres cepas antagonistas.

TABLA 1. Efecto del tratamiento de semillas sobre la incidencia de enfermedades bacterianas en plántulas de pepino var. Poinsett y melón var. Hale's Best. (Tabla de contingencia. Estadígrafo χ^2).

Tratamientos	Interacción				χ^2 Práctico	
	Pepino - <i>X. cucurbitae</i>		Melón - <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>		Interacción	
	Plantas enfermas	Plantas sanas	Plantas enfermas	Plantas sanas	Pepino - <i>X. cucurbitae</i>	Melón - <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
Tinoculado	33	27	24	36	35.81* p=0.01	35.53* p=0.01
<i>Bacillus subtilis</i> F16/95	4	56	6	54	Xph - 2.15 n. s.	Xph - 1.08 n. s.
<i>Bacillus subtilis</i> Xph	9	51	3	57	14A - 1.45 n. s.	14A - n. d.
<i>Pseudomonas putida</i> 14A	6	54	3	57	F16/95-0.44 n. s.	F16/95 -1.08 n. s.

La incidencia de la Mancha bacteriana de las cucurbitáceas en plántulas de pepino var. Poinsett presentó una reducción del 87% con la cepa F16/95, pero no difirió estadísticamente de los tratamientos con las cepas 14A y Xph que redujeron en 81% y 72%, respectivamente. Mientras en plántulas de melón de Castilla var. Hale's Best la incidencia de la Mancha bacteriana del fruto de melón alcanzó una reducción de 87,5% con las cepas Xph y 14A y de 75% con la cepa F16/95, aunque no hubo diferencias significativas entre tratamientos. En particular, ensayos *in vivo* para el control de la Mancha bacteriana del fruto de melón mediante la nebulización de semillas con cepas antagonistas del género *Bacillus*, mostraron que *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 proporcionó una reducción de 89.1% de la incidencia (Santos y col., 2006). Los resultados del tratamiento de semillas de pepino var. Poinsett y de melón de Castilla var. Hale's Best alcanzaron reducciones de la incidencia de ambas enfermedades bacterianas entre 72% y 87,5%.

El tratamiento con la cepa *B. subtilis* F16/95 de semillas de calabaza var. INIVIT C-88, diagnosticadas con infección natural por *Xanthomonas cucurbitae*, mostró una incidencia significativamente menor de la Mancha bacteriana de las cucurbitáceas en relación con el tratamiento químico (Tabla 2).

Se observó el efecto adverso del tratamiento químico sobre la germinación, que alcanzó un valor de 76% en contraste con el tratamiento biológico (92%) y los testigos (96%), así como la aparición de hojas cloróticas en plántulas. La baja efectividad del tratamiento con ácido clorhídrico se atribuye a la falta de control del inóculo interno, en tanto la afectación severa de la germinación y la aparición de hojas cloróticas se deben a la fitotoxicidad de compuestos tales como el ácido clorhídrico (McGee, 1995).

TABLA 2. Efectos de los tratamientos químico y biológico de semillas sobre la Mancha bacteriana de las cucurbitáceas en plantas de calabaza var. INIVIT C – 88. (Tabla de contingencia. Estadígrafo (Chi -cuadrado)

Tratamiento Químico	Enfermas	Sanas	Tratamiento Biológico	Enfermas	Sanas	χ^2 p=0,01
H ₂ O + Adherente	66	34	H ₂ O	69	31	Práctico: 35.53* Teórico: 11, 34
ClH + Adherente 1%	48	52	F16/95	32	68	

La reducción significativa de la incidencia de las enfermedades bacterianas blanco de los experimentos, destaca el potencial de las rizobacterias antagonistas para el control biológico de enfermedades que tienen importancia económica en la producción de cultivos de cucurbitáceas.

La Mancha bacteriana de las cucurbitáceas tiene como principal fuente de transmisión la semilla y el rango de hospedantes de *X. cucurbitae* comprende los cultivos de pepino, calabaza, melón de agua y de Castilla. Aunque aparece en las plántulas, la infección de los frutos constituye la fase más dañina de la enfermedad, debido a la pudrición acuosa provocada por otros organismos que penetran por la ruptura de la corteza en la zona donde confluyen las manchas (Zitter y col., 1996).

El agente etiológico de la Mancha bacteriana del fruto de melón, *A. avenae* subsp. *citrulli*, es transmitido a través de la semilla. Aunque se informó la enfermedad por primera vez en plántulas de melón de agua en Estados Unidos, en años recientes este patógeno ha ocasionado pérdidas económicas significativas en otras especies de cucurbitáceas cultivadas, tales como melón de Castilla, pepino, calabacín y calabaza en muchas partes del mundo (Burdman y col., 2005)

La incidencia de la pudrición de la raíz provocada por *Fusarium oxysporum* en melón var. Hale's Best (Tabla 3) fue menor en los tratamientos con las rizobacterias (p=0,01) y el hongo antagonista *Trichoderma harzianum* cepa A-34 (p=0,05), en comparación con el testigo crecido en suelo inoculado con el hongo fitopatógeno, aunque la aplicación de las rizobacterias antagonistas resultó en una significativa reducción de la enfermedad respecto al tratamiento con el hongo antagonista.

Tabla 3. Incidencia de la enfermedad provocada por *Fusarium oxysporum* en plántulas de melón de Castilla var. Hale's Best. (Tabla de contingencia. Estadígrafo χ^2)

Tratamientos	Plantas Enfermas	Plantas sanas	χ^2 Práctico
Ti	27	33	14.47 * p=0.01
F16/95	10	50	Xph - 0.22 n. s.
Xph	12	48	14A -n. d.
14A	12	48	F16/95 - 0.22 n. s.
Th A-34	18	42	Ti-2.88* p=0.05

Se evaluaron 20 plantas por tratamiento en 3 repeticiones

Resulta promisorio el efecto del tratamiento de semillas con las rizobacterias sobre la pudrición de la raíz por *Fusarium oxysporum*, una enfermedad que afecta principalmente las plántulas y el control es difícil, ya que la persistencia del hongo en el suelo puede durar años y no se recomienda sembrar cucurbitáceas por un periodo de cinco a siete años en terrenos infectados (Zitter, 1999).

Por otro lado, el tratamiento de semillas de cucurbitáceas con un biopreparado del hongo antagonista *Trichoderma harzianum* cepa A-34 no incluye *Fusarium oxysporum* en el espectro de acción (Stefanova, 2004), lo cual destaca la alternativa que representan las cepas de rizobacterias antagonistas *Bacillus subtilis* F16/95, *Bacillus subtilis* Xph y *Pseudomonas putida* 14A para el control de este importante patógeno de los cultivos de cucurbitáceas.

El efecto de la cepa *Pseudomonas putida* 14A sobre la pudrición de la raíz provocada por *F. oxysporum* en los experimentos *in vivo*, justificó la previsión de no descartar ningún potencial antagonista en la fase de selección *in vitro*. Se ha señalado que la inhibición en las condiciones de sustratos artificiales tiene lugar mediante la producción de metabolitos que dependen fuertemente del sustrato utilizado y, además, la diferencia existente entre los sustratos artificiales ricos en nutrientes en comparación con los naturales, por lo general limitados, representa una variación de las condiciones en que ocurre la interacción antagonista-patógeno (Sandys-Winsch y col., 1994; Whipps, 1997). También se conocen cepas de *Pseudomonas* fluorescentes que no mostraron antagonismo *in vitro* y tuvieron efecto supresor sobre enfermedades de cultivos agrícolas (Kloepper y col., 1991).

Por otro lado, los datos obtenidos de los tres experimentos consecutivos indican que las cepas de rizobacterias antagonistas *Bacillus subtilis* F16/95, *Bacillus subtilis* Xph y *Pseudomonas putida* 14A tienen potencial para el control biológico de *Xanthomonas cucurbitae*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* y *Fusarium oxysporum* en un suelo donde la microflora indígena fue eliminada mediante esterilización con calor húmedo. Se requieren ulteriores experimentos para observar si las cepas antagonistas exhiben el efecto reductor de la incidencia de las enfermedades en suelo no esterilizado donde esté presente la microflora indígena.

El efecto beneficioso de las rizobacterias radica en diferentes mecanismos como base de su actividad antagónica en el control de enfermedades de los cultivos agrícolas (Compant y col., 2005), entre los que destacan: antibiosis,

competencia por el hierro mediante la producción de sideróforos, inducción de resistencia en la planta y parasitismo.

Uno de los mayores determinantes del control biológico de enfermedades ejercido por especies de *Pseudomonas* fluorescentes es el antibiótico 2,4 diacetilfloroglucinol (*Phl*), cuya producción es estimulada en presencia de concentraciones crecientes de hierro (Dunne y col., 1996). En el caso de la cepa *Pseudomonas putida* 14A no se observó actividad inhibitoria en un medio suplementado con hierro, mientras la interacción *in vivo* se desarrolló sobre un sustrato de suelo pardo mullido carbonatado (Instituto de Suelos, 1999) de bajo contenido en hierro, por lo cual no se considera atribuible a la actividad de *Phl* el efecto de control de esta cepa sobre los microorganismos fitopatógenos blanco de los experimentos.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que otro modo de acción, tal como la inducción de resistencia sistémica en las plántulas de pepino y melón de Castilla pudiera estar involucrado en la interacción *in vivo* entre las cepas de rizobacterias *Bacillus subtilis* F16/95, *Bacillus subtilis* Xph y *Pseudomonas putida* 14A y las cepas de fitopatógenos ensayadas. Este mecanismo de acción está relacionado con un proceso de resistencia activa dependiente de las barreras físicas o químicas de la planta hospedante, que es activado por agentes inductores bióticos y abióticos (Kloepper y col., 1992).

El término resistencia sistémica inducida (*ISR* por sus siglas en inglés) se aplica a la resistencia inducida por *Pseudomonas* spp. y otras bacterias Gram negativas no patogénicas colonizadoras de la rizosfera (Pieterse y col., 1996). Por otra parte, Kloepper y col. (2004) demostraron que algunas cepas de bacterias Gram positivas del género *Bacillus* indujeron resistencia sistémica en melón de Castilla, melón de agua y pepino contra patógenos fungosos y bacterianos, mediante experimentos en casas de cultivo y en campo. Las cepas de rizobacterias que se evalúan en este trabajo corresponden a especies de ambos géneros.

Se han identificado derivados gaseosos naturales producidos por cepas de rizobacterias como potentes activadores de respuestas de las plantas para la elicitación de *ISR*, entre los que se incluyen metil-salicilato, metil-jasmonato y etileno (Ryu y col., 2004). Por otra parte, entre los sideróforos que desempeñan un importante rol en el antagonismo de las rizobacterias contra los agentes fitopatógenos se encuentra un tipo de sideróforo catecol (Franza *et al.*, 2005) producido por rizobacterias *in vivo* bajo condiciones limitadas de hierro, que contribuye a la inducción de resistencia sistémica (Press, 2001).

El efecto supresor *in vivo* de la cepa *Pseudomonas putida* 14A sobre la enfermedad provocada por *Fusarium oxysporum* podría ser atribuido tanto a la producción de derivados gaseosos naturales, cuyo efecto no es posible detectar

in vitro, como a sideróforos catecol inductores de ISR, dado que estos se expresan en condiciones limitantes de hierro en un sustrato natural.

Se requieren ulteriores estudios estructurales y bioquímicos que confirmen la ocurrencia de cambios en las interacciones investigadas, tales como la presencia de cambios morfológicos en las raíces de plantas que muestran este tipo de resistencia (Benhamou, 2000); así como incrementos en los niveles de determinadas enzimas (Chen, y col., 2000) e incremento de la producción de fitoalexinas (Ongena y col., 1999).

Las rizobacterias inductoras de resistencia sistémica se ha demostrado que median en la protección contra múltiples patógenos (Kloepper y col., 2004), lo cual sugiere que las cepas ensayadas en esta investigación despliegan el modo de acción relacionado con ISR, si se tiene en cuenta la reducción en la incidencia de las tres enfermedades bajo tratamiento biológico.

Precisamente una de las barreras que se plantean al uso de las rizobacterias antagonistas como agentes de control biológico para el tratamiento de semillas es la acción limitada a un solo fitopatógeno (McSpadden y Fravel, 2002). En las condiciones de esta investigación, cada una de las cepas de rizobacterias antagonistas aplicadas en el tratamiento de semillas de pepino y de melón demostró su efectividad ante más de un patógeno.

Sin embargo, la adopción de la tecnología del tratamiento de semillas con agentes de control biológico presenta limitaciones debido a dificultades relacionadas con la formulación, persistencia de los productos y efectividad en comparación con los fungicidas sintéticos (McSpadden y Fravel, 2002). Además, la limitada comprensión de la ecología de la rizosfera, el lanzamiento de algunos productos que no satisficieron las expectativas, la inseguridad sobre la magnitud de las oportunidades comerciales, el rigor de las patentes y el coste del registro han dificultado el desarrollo de este mercado (McSpadden, 2006).

A pesar de las limitaciones señaladas, se ha confirmado la efectividad del tratamiento biológico de semillas de pepino (*C. sativus*) con un biopreparado cuyo agente activo es la bacteria *Pseudomonas putida* para el control de enfermedades fungosas (Boado y col., 2002); también el tratamiento de semillas de melón (*C. melo*) con la formulación en polvo de cepas de *P. putida* redujo la severidad del marchitamiento por *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Boral y col., 2004).

El abonado orgánico con vermicompost es otro factor que se sugiere considerar en la reducción de la incidencia de las enfermedades producidas por los patógenos ensayados, a partir de los resultados de investigaciones sobre el efecto de los abonos orgánicos y la contribución de los componentes biológico y químico de los suelos abonados con compost a la supresión de enfermedades (Kuc, 2001; Postma y col., 2003).

Efecto de las rizobacterias antagonistas sobre el crecimiento de las plantas

El tratamiento biológico de semillas de pepino var. Poinsett, melón var. Hale's Best y calabaza var. INIVIT C-88 con las cepas de rizobacterias antagonistas en las interacciones con los diferentes microorganismos fitopatógenos, mostró el

efecto estimulante sobre el crecimiento vegetal (fig.1), expresado en las medias de los valores alcanzados por las variables longitud del tallo y peso fresco de raíces y hojas cotiledonales, que fueron significativamente mayores (Prueba de Tukey, $p=0.05$) en comparación con los testigos sanos.



Fig.1 Efecto estimulante de las rizobacterias antagonistas sobre el crecimiento de plantas de cucurbitáceas mediante el tratamiento de semillas. **A:** Interacción pepino-*X. cucurbitae*. **B:** Interacción melón- *A. avenae citrulli*. **C:** Interacción melón-*F. oxysporum*.

La técnica de aplicación de bacterias a las semillas atrajo el interés de los investigadores no solo por el control biológico de rizobacterias frente a agentes fitopatógenos, sino por el efecto sobre el crecimiento o el desarrollo en varios cultivos, expresado en el incremento de la emergencia de las semillas (Glick, 1997), el peso de las plantas (Cleyet-Marcel y col., 2001) y el rendimiento de las cosechas (Klopper y col., 1999). El incremento del crecimiento de plantas de melón de agua y melón de Castilla mediante la inoculación conjunta de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* (LS213) se comprobó mediante experimentos en casas de cultivo (Vavrina, 1999).

Las rizobacterias beneficiosas pueden inducir la estimulación del crecimiento de las plantas por mecanismos directos que comprenden la producción de reguladores del crecimiento vegetal conocidos como fitoestimuladores, entre los que se incluyen el ácido indol-acético (IAA), ácido giberélico, citoquininas, y en algunos casos etileno. En particular, la producción de IAA parece ser uno de los rasgos promotores de crecimiento de las plantas más prevalecientes entre las PGPR. (Ahmad y col., 2008).

Colonización de raíces por las rizobacterias antagonistas

Las cepas de rizobacterias *Bacillus subtilis* (F16/95, Xph) y *Pseudomonas putida* 14A aplicadas a las semillas de cucurbitáceas en concentración de 10^8 ufc ml^{-1} mostraron un crecimiento típicamente exponencial sobre la superficie de las raíces en los primeros días posteriores a la inoculación.

Las densidades de población recobradas de la rizosfera de pepino y melón de Castilla alcanzaron medias en un rango de 8,9-8,0 log (ufc cm^{-1} de raíz) a los 4 días después de la siembra, y declinaron en medias de 7,8-7,0 log (ufc cm^{-1} de raíz) a los 15 días. Estos rangos corresponden con los resultados obtenidos por

diferentes investigadores que describen la rápida distribución de las rizobacterias, una alta concentración en la semilla y en la parte superior de las raíces inicialmente, y la colonización de las puntas de las raíces hasta más de 6 días después de la siembra (Beauchamp y Kloepper, 2003; Yan y col., 2003).

Las cepas F16/95 y Xph de *Bacillus subtilis* y 14A de *Pseudomonas putida* mostraron medias similares, aunque referidas a las poblaciones por segmento lineal; en tanto Press y col. (2001) informaron sobre una cepa de PGPR aplicada a semillas de pepino que alcanzó densidades de población medias de 8,5 y 7,2 log (ufc g⁻¹ de raíz) a los 4 y 15 días posteriores a la siembra.

La cepa *Pseudomonas putida* 14A mostró valores significativamente superiores de las medias de densidad de población en la colonización de raíces en las diferentes interacciones planta-patógeno-antagonista. Las rizobacterias del género *Pseudomonas* se consideran uno de los mejores colonizadores de raíces y se utilizan de modelo (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

El término *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (siglas en inglés PGPR) fue introducido por Kloepper y Schroth (1978) para agrupar las rizobacterias beneficiosas independientemente de los diferentes grupos taxonómicos a que pertenezcan (Compant y col., 2005).

La característica de ser bacterias de vida libre en el suelo, capaces de colonizar las semillas y por ende las raíces, favoreciendo el crecimiento o desarrollo de la planta con su actividad, permite incluir las cepas de rizobacterias antagonistas *Bacillus subtilis* F16/95, *Bacillus subtilis* Xph y *Pseudomonas putida* 14A en el grupo de las PGPR, según la definición de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Shishido y Chanway, 1998).

Además, las cepas *Bacillus subtilis* (F16/95, Xph) y *Pseudomonas putida* 14A estimularon el crecimiento de las plantas indirectamente mediante la reducción significativa de la incidencia de las enfermedades Mancha bacteriana de las cucurbitáceas, Mancha bacteriana del fruto de melón y pudrición de la raíz provocadas por *Xanthomonas cucurbitae*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente. Un rasgo reconocido en las PGPR es el efecto indirecto sobre enfermedades bien conocidas provocadas por patógenos mayores (Compant y col., 2005).

Los experimentos de bacterización de semillas de cucurbitáceas con las cepas de PGPR *Bacillus subtilis* (F16/95, Xph) y *Pseudomonas putida* 14A muestran promisorios resultados respecto a la colonización de raíces y la estimulación del crecimiento de las plantas bajo condiciones controladas. Sin embargo, el proceso de colonización de las raíces por las PGPR transcurre en un ambiente competitivo, esto es, en suelos de campo que no son pasteurizados ni esterilizados, bajo la influencia de muchos parámetros bióticos y abióticos (Antoun y Prevost, 2005).

La realización de experimentos de campo es una exigencia en el proceso de validación de las cepas *Bacillus subtilis* (F16/95, Xph) y *Pseudomonas putida* 14A como agentes de control biológico de enfermedades de las cucurbitáceas, si se tiene en cuenta que resulta imprescindible la integración práctica del control

biológico en la tecnología de semillas, a partir del fundamento de un programa de Manejo Integrado de Plagas apropiado en un sistema de cultivo anual (Murray y col., 2002).

CONCLUSIONES

El tratamiento de semillas de cucurbitáceas con las cepas *Bacillus subtilis* F16/95, *Bacillus subtilis* Xph y *Pseudomonas putida* 14A redujo significativamente la incidencia de las enfermedades provocadas por los patógenos *Xanthomonas cucurbitae*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* y *Fusarium oxysporum*.

Cada una de las cepas antagonistas medió en el control biológico de estos patógenos.

Se comprobó el efecto estimulante de las cepas *Bacillus subtilis* F16/95, *Bacillus subtilis* Xph y *Pseudomonas putida* 14A, aplicadas en el tratamiento de semillas de cucurbitáceas, sobre el crecimiento de las plantas, por lo que se incluyen en el grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

RECOMENDACIONES

Realizar estudios estructurales y bioquímicos para determinar cambios en las plantas debidos a la inducción de resistencia sistémica por las rizobacterias.

Evaluar las interacciones *in vitro* entre las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y microorganismos biofertilizantes, agentes de control biológico de plagas agrícolas y fungicidas sintéticos.

Probar la efectividad del tratamiento de semillas con las cepas de PGPR en el sistema de producción de semillas de cucurbitáceas bajo condiciones de campo con diferentes tipos de suelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M.S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173–181.
- Altieri, M. A. (1997). Manejo de enfermedades En *Agroecología Bases científicas para una agricultura sustentable* (679). La Habana: CLADES/ACAO.
- Antoun, H. & Prévost, D. (2005). Ecology of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 1–38 Z. A. Siddiqui (ed.). The Netherlands: Springer.
- Beauchamp, C. J. & Kloepper, J. W. (2003). Spatial and Temporal Distribution of a Bioluminescent-marked *Pseudomonas putida* on Soybean root. *Luminescence* 18(6):346–351.

- Boado, I., Quintana, E. y Pelayo, E. (2002). Biopreparado en la producción de hortalizas. Certificado de Autor de Invención CU 22798 AI. Fecha de publicación: 2002.12.19 Oficina Cubana de la Propiedad Industrial República de Cuba.
- Boral, T., Ozaktan, H., Gore, E. & Aslan, E. (2004). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulation of the two strain of *Pseudomonas putida*. *Journal of Phytopathology* 152(8-9):471.
- Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G. & Kopelowitz, J. (2005). Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. *Plant Dis.* 89:1339-1347.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. & Barka, E. A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9):4951-4959
- Dunne, C., Delanny, I.; Fenton; A. & O'Gara, F. (1996). Mechanisms involved in biocontrol by microbial inoculants. *Agronomie* 16:721-729.
- Instituto de Suelos Ministerio de la Agricultura. (1999). *Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba*. AGRINFOR: La Habana
- Kloepper J, Tuzun S, Kuo J. (1992). Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science and Technology* 2:347-349.
- Kloepper, J. W., Ryu, C.-M. & Zhang, S. (2004). Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94: 1259-1266.
- Kuč, J. (2001). Concepts and directions of induced systemic resistance in plant and its applications. *Eur. J. Plant Pathol.* 107:7-12.
- Larson, B. C., Mossier, M.A. & Nesheim, O.N. (1999). Florida Crop/Pest Management Profile: Watermelon. Disponible en <http://edis.at.ufl.edu/pdffiles/PI/PI03100.pdf>.
- Lugtenberg B. y Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541-556
- McGee, D. C. (1995). An Epidemiological Approach to Disease Management through Seed Technology *Annual Review of Phytopathology* 33: 445-466.
- McSpadden, B. B., Fravel, D.R. (2002). Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization and Application in the USA. Disponible en http://www.phcmexico.com.mx/apsnet_biological_Control.html
- Moffett, M. L. & Wood, B. Seed treatment for bacterial spot of pumpkin. *Plant Disease Reporter*, 1979, 63:537-539.
- Muñoz, M. y Monterroso, D. (2002). Identificación de *Acidovorax avenae citrulli* en semillas de sandía en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica) No. 66:105-110.
- Pieterse, CM.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A. & Van Loon, L.C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria. *Plant Cell* 8:1225-1237.
- Postma J, Montanari M, Boogert PHJF. (2003). Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity of compost. *Eur J Soil Biol.* 39:157-163 doi: 10.1016/S1164-5563(03)00031-1.
- Ryu, C-M. et al. (2008). Dynamic communication between plants and rhizobacteria via volatile signals. Procedures of the 13th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Lorito, M., Woo, S.L. & Scala, F. (Ed). *Biology of Plant-Microbe Interactions*, Vol. 6.

- Santos, (2006). Biocontrole da *mancha*-aquosa do melão pelo tratamento de sementes com bactérias Disponible em <http://www.seb.org.br/eventos/SICONBIOL/XSiconbiol/XSiconbiol-resumos.pdf>
- Sandys-Winsch, D. C., Whipps, J. S.; Fenlon J. S., Lynch. J. M.(1994).The validity of in vitro screening methods in the search for fungal antagonists of *Sclerotinia sclerotiorum* causing wilt of sunflower. *Biocontrol Science and Technol.* 4:269-277.
- Stefanova, M. (2004). Producción y aplicación de *Trichoderma* spp. como antagonista de hongos fitopatógenos. Disponible en <http://www.aguascalientes.gob.mx/agro/produce/TRICHOD.htm>
- Whipps, J. M. (1997). Developments in biological control of soilborne plant pathogens. *Adv. Bot. Res.*26:1-134
- Yan, Z., Reddy, M.S., & Kloepper, J.W. (2000).Survival and colonization of rhizobacteria in tomato transplant system. *Can. J. Microbiol.*, 2000, 49:383-389.
- Yang, J., Kloepper, J.W. & Ryu, C.-M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14: 1-4.
- Zhang, S., White, T. L., Martinez, M. C. McInroy, J. A., Kloepper, J. W., Klassen, W. (2010). Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of *Phytophthora* blight on squash under greenhouse conditions. *Biological Control* 53: 129-135
- Zitter, T.A., Hopkins, D.L. & Thomas, C.E. (1996). *Compendium of Cucurbit Diseases*. Disponible en www.hort.uconn.edu/ipm/veg/htms/lffrcui.htm
- Zitter, T.A. (1999). Fusarium wilts of melon, a worldwide problem in temperate and tropical regions. Disponible en <http://www.actahort.org/>