

Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador

Antagonism of rhizobacteria on phytopathogenic fungi, and their microbial activity with biofertilizer, biostimulant and biocontroller potential

Erika Lorena Blanco*, **Yulimar Castro****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.84808

RESUMEN

Las rizobacterias forman parte de la gran cantidad de microorganismos que actúan como agentes de biocontrol, produciendo metabolitos que inducen resistencia sistémica en las plantas que inhiben el crecimiento de patógenos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de diez rizobacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Ochrobactrum* y *Pseudomonas* para producir ácido cianhídrico (HCN), sideróforos y ácido indol-acético (AIA), disolver fosfato, fijar nitrógeno e inhibir el crecimiento de fitopatógenos. Se realizaron todas las pruebas fisiológicas y bioquímicas correspondientes, así como la prueba de antagonismo *in vitro* contra los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizoctonia solani*. Cinco cepas produjeron una mayor cantidad de AIA en relación a las otras en presencia de triptófano, la cepa ES1 (*Ochrobactrum* sp.) produjo HCN, el 50 % de las cepas evaluadas liberaron sideróforos, el 60 % disolvió fósforo, y todas resultaron positivas para la fijación de nitrógeno. Nueve cepas inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* entre 40 % y 65 %, la cepa Alf (*Pseudomonas fluorescens*) inhibió además el crecimiento de *C. gloeosporioides* en un 22 %, y ninguna inhibió el crecimiento de *R. solani*. Los rizobios evaluados y la cepa de *Pseudomonas fluorescens* podrían ejercer efectos beneficiosos sobre las plantas a través de mecanismos directos e indirectos, o una combinación de ambos, lo que las convierte en una opción sostenible para la producción de cultivos.

Palabras clave: rizobios, *Pseudomonas fluorescens*, mecanismos promotores de crecimiento vegetal, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*.

ABSTRACT

Rhizobacteria are part of the large number of microorganisms that act as biocontrol agents, producing metabolites that induce systemic resistance in plants and inhibit the growth of pathogens. The objective of this research was to evaluate the capacity of ten rhizobacteria of the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Ochrobactrum* and *Pseudomonas* to produce hydrogen cyanide (HCN), siderophores and indole acetic acid (IAA), dissolve phosphate, fix nitrogen and inhibit the growth of phyto-

* Candidata a Doctora en Ecología Tropical. Laboratorio de Fitobiotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela / Laboratorio de Biotecnología y Química de Polímeros, Decanato de Investigación, Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Venezuela (dirección actual), ORCID: 0000-0001-6190-9670, elorenablancoc@gmail.com.

** Estudiante de Doctorado en Microbiología Agrícola. Laboratorio de Fitobiotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela / Laboratório de Fermentações, Programa Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidad Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, ORCID: 0000-0002-3828-0373, yulimarcstromolina@gmail.com.

pathogens. All the corresponding physiological and biochemical tests were carried out, in addition to an *in vitro* antagonism test against the phytopathogens *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizoctonia solani*. Five strains produced a greater amount of IAA with respect to the others in the presence of tryptophan, the strain ES1 (*Ochrobactrum* sp.) produced HCN, 50% of the evaluated strains released siderophores, 60% solubilized phosphorus and all were positive for nitrogen fixation. Nine strains inhibited the growth of *F. oxysporum* by 40% to 65%. The Alf strain (*Pseudomonas fluorescens*) inhibited the growth of *C. gloeosporioides* by 22% while none inhibited the growth of *R. solani*. The rhizobia tested and the *Pseudomonas fluorescens* strain may have favorable effects on plants through direct and indirect mechanisms, or a combination of both, making them a sustainable option for crop production.

Key words: rhizobia, *Pseudomonas fluorescens*, plant growth promoter mechanisms, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*.

Recibido: enero 31 de 2020 **Aprobado:** abril 30 de 2021

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos antagonistas (bacterias y hongos) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes fitopatógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en cultivos hortícolas. En cultivos comerciales las medidas de control se basan en el uso de agroquímicos, práctica que está variando a la implementación de controles biológicos con el propósito de proteger y mitigar el impacto sobre el medio ambiente (Agrios, 2005; Boukaya *et al.*, 2018; Alcedo y Reyes, 2018; Márquez *et al.*, 2020). Para implementar estas alternativas es necesario conocer la biología de los organismos que interactúan en los cultivos (Agrios, 2005).

Las rizobacterias forman parte de la gran cantidad de microorganismos biológicos asociados a la rizósfera que actúan como agentes de control de enfermedades fúngicas y bacterianas, tanto en la parte aérea como en la raíz de las plantas hospedadoras, además son promotoras del crecimiento y desarrollo de los vegetales (Mondino y Vero, 2006; Alcedo y Reyes, 2018). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) pueden actuar sobre la planta de dos maneras: directa, facilitando a la planta compuestos sintetizados por ellas mismas o por medio de procesos bioquímicos (fitohormonas, fijación biológica de nitrógeno, quelación de hierro y disolución de fósforo), produciendo así un beneficio a la planta; indirecta, a través del mecanismo Biocontrol-BPCV.

Varios estudios han demostrado que determinadas cepas bacterianas bajo condiciones controladas, suprimen

el crecimiento de hongos fitopatógenos (Xue *et al.*, 2015). Entre estas, las rizobacterias logran la protección de las plantas contra microorganismos fitopatógenos por medio de la competencia por espacio o nutrientes, producción de metabolitos y antibióticos, secreción de diversas enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los patógenos, producción de sideróforos e incremento de la capacidad de respuesta sistémica de la planta frente a los microorganismos agresores (Bhattacharyya y Jha, 2012; Márquez *et al.*, 2020). Dentro de este grupo se puede mencionar a las *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *fluorescens*, *putida*), *Bacillus* y *Burkholderia*, que son las más usadas para el control de enfermedades en plantas (Ezziyany *et al.*, 2004a).

Uno de los elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la mayoría de los microorganismos que habitan en el suelo es el hierro, debido a su función en reacciones enzimáticas de óxido-reducción (Hernández *et al.*, 2004). Algunas rizobacterias aplican cierta estrategia para asimilar este elemento cuando se encuentra en el suelo en pequeñas cantidades, produciendo una sustancia de bajo peso molecular afín al ion Fe⁺, denominado sideróforo, que se encarga de atraparlo impidiendo que esté disponible para otros microorganismos, ejerciendo así el control biológico de enfermedades importantes, tales como *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Phytophthora* sp. (Bagg y Neilands, 1987; Kundan *et al.*, 2015).

Otro de los compuestos producidos por estos microorganismos es el ácido cianhídrico (HCN), que tiene funciones como elicitador de la respuesta sistémica inducida, así como promotor del crecimiento y de antagonista

contra hongos fitopatógenos (Meldau *et al.*, 2013). Sin embargo, estas sustancias, producidas en grandes cantidades, pueden alterar considerablemente la actividad fisiológica de la planta (Compant *et al.*, 2005). También se ha observado que el HCN actúa como un agente eficaz para el biocontrol de las malas hierbas, y que inhibe la acción de la citocromo oxidasa (Kundan *et al.*, 2015).

Algunos de los hongos fitopatógenos más comunes del suelo que afectan los cultivos hortícolas, son *Fusarium oxysporum* (Schltdl.), y *Rhizoctonia solani* (J. G. Kühn). Existen otros patógenos comunes que inciden sobre el follaje como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. El control de estos fitopatógenos se hace con la aplicación de fungicidas de amplio espectro; sin embargo, estas estrategias de control químico han generado la emergencia de cepas resistentes, además de efectos negativos en la salud pública y el medio ambiente (Fravel *et al.*, 2003). Sus efectos negativos constituyen una limitante para la producción, ocasionando pérdidas económicas en las zonas agrícolas del estado Mérida, Venezuela. Esta problemática permite plantear el uso de estrategias de control biológico, importantes para la recuperación del equilibrio de los agroecosistemas y para el aprovechamiento del potencial antagonista natural de ciertos microorganismos autóctonos como hongos y rizobacterias contra patógenos vulnerables (Avendaño *et al.*, 2006; Márquez *et al.*, 2020).

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar *in vitro* la actividad microbiana de las rizobacterias como potenciales antagonistas de los hongos *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* y *R. solani* y algunos mecanismos directos e indirectos que pueden estimular el crecimiento vegetal para promover su utilización en la agricultura sostenible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron diez cepas rizobacterianas aisladas de diferentes zonas del estado Mérida, Venezuela y preservadas en el Laboratorio de Fitobiotecnología-ULA, que mostraron potencial biofertilizante sobre pimentón y lechuga (Blanco *et al.*, 2018). Las cepas usadas fueron ME01 (*Rhizobium tropici*), Nod2rojo (*Bradyrhizobium*

japonicum) y RmBorbellón (*Sinorhizobium* spp.) (Marquina *et al.*, 2011), Leu2A (*Bradyrhizobium japonicum*), CP, YE1 y Med (*Bradyrhizobium* spp.), ES1 y EV1 (*Ochrobactrum* spp.) y Alf (*Pseudomonas fluorescens*) (Blanco *et al.*, 2018). Los fitopatógenos utilizados fueron tres cepas almacenadas en el Laboratorio de Fitopatología IIAP-ULA e identificados como *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Rhizoctonia solani*.

Pruebas fisiológicas

Se probó la tolerancia a la salinidad de las rizobacterias en medio agarizado extracto de levadura-manitol YMA modificado con 0.5 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0.2 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 0.1 g.L⁻¹ NaCl, 0.5 g.L⁻¹ extracto de levadura, 2.5 g.L⁻¹ manitol, 7.5 g.L⁻¹ sacarosa, 2.5 mg.mL⁻¹ rojo congo pH 6.7 - 6.8 (Vincent, 1975) a 29 °C, desde 0.01 % hasta 2.5 % de NaCl. En el mismo medio se probó el crecimiento en temperaturas desde 5 °C hasta 40 °C. Adicionalmente se verificó la producción de ácido o álcali en medio ELMABAT durante tres días a 29 °C (Ferrera *et al.*, 1993).

Pruebas bioquímicas

Se determinó la producción de ácido cianhídrico (HCN) por el método cualitativo modificado por Wei *et al.* (1991), mediante siembra por agotamiento de las rizobacterias en placas con medio TSA suplementado con 4.4 g.L⁻¹ de glicina, en las que se colocaron en la tapa de la placa de Petri tiras de papel filtro sumergidas en una solución de carbonato de sodio 12,5 % y ácido pícrico 2,5 %, indicando producción de HCN mediante un cambio de coloración de las tiras de amarillo a anaranjado-marrón (moderado) y amarillo a rojo (fuerte) durante 2-4 días (Bakker y Schippers, 1987; Wei *et al.*, 1991).

La producción de sideróforos se detectó por la prueba del Cromo Azurol-S (CAS) (Schwyn y Neilands, 1987), en sustrato base medio B de King (Glickmann y Desaux, 1995). La producción positiva de sideróforos se observó mediante la formación de un halo anaranjado-amarillo alrededor de la colonia de cada rizobacteria.

La fijación de N se determinó mediante el crecimiento en medio manitol (Holt y Krieg, 1994). La actividad disolvente de fosfatos se determinó incubando 10 µL de cada inóculo rizobacteriano 1 x 10⁸ cel.mL⁻¹ de medio salino 0.80 % NaCl, en medio mínimo (MM) sólido su-

plementado con fosfato tricálcico, y observando el halo de disolución (Reyes *et al.*, 1999). La temperatura de incubación para todas las pruebas fue 29 °C.

Medición cuantitativa de AIA

La producción de ácido indol-acético (AIA) se determinó con base a los protocolos de Bric *et al.* (1991) y Glickmann y Desaux (1995). Las concentraciones de AIA empleadas para la curva patrón fueron 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se evaluó la producción de AIA en ausencia y presencia de 0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de L-triptófano (Glickmann y Dessaux, 1995). Para esto se incubaron 500 μL de inóculo 1×10^8 $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ de las rizobacterias en 3 mL de MM (Reyes *et al.*, 1999) suplementado o no con 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de triptófano (Trp) durante 120 h en oscuridad y agitación de 120 rpm a 30 °C. Posteriormente para cada tratamiento se tomaron 2,5 mL del cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugaron por 10 minutos a 4 000 rpm. El reactivo de Salkowski se preparó con la relación 2:1 de FeCl_3 10 mM y HClO_4 3.5 M respectivamente (Bric *et al.*, 1991), y para la reacción se preparó una proporción 1:2 con el AIA (sobrenadante) y el reactivo de Salkowski, respectivamente. Las muestras reaccionaron durante 30 minutos en oscuridad y se determinó la concentración de AIA a 530 nm en un espectrofotómetro de luz visible (Spectronic 20). Se utilizaron tres réplicas por tratamiento, y se usó como blanco el MM estéril suplementado con Trp. También se incluyó *Azospirillum brasilense* (Sp7) como control microbiano positivo (Dobbelaere *et al.*, 1999), y un control de MM estéril en solución salina a 0.89 % NaCl.

Ensayo de actividad antagónica

Se evaluó el potencial biocontrolador *in vitro* de las rizobacterias sobre *F. oxysporum*, *C. gloeosporioides* y *R. solani* mediante enfrentamientos en placas de Petri (Ezziyyani *et al.*, 2004b) conteniendo medio PDA (Cañedo y Ames, 2004). Se colocó por triplicado 10 μL del inóculo 1×10^8 $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ cada rizobacteria a 3 cm de distancia entre sí, y a las 24 h de incubación a 29 °C, se colocaron discos de agar de 8 mm de diámetro de cada fitopatógeno en estado de micelio (5-8 días de crecimiento) y se incubó a temperatura ambiente (22 °C aproximadamente) durante 8 días. Finalmente se midió el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)

del fitopatógeno, mediante la fórmula $\text{PICR} = (\text{R1} - \text{R2}) / \text{R1} \times 100$ (Ezziyyani *et al.*, 2004b).

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante un ANOVA con el programa estadístico Statgraphics® en su versión 5.1. Además, se realizó la comparación de medias entre los tratamientos por el test de la mínima diferencia significativa (LSD) a $P < 0.05$. Las pruebas que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas (Montgomery, 1991) se sometieron a la prueba Kruskal Wallis con el programa estadístico Infostat®.

RESULTADOS

Tolerancia a la salinidad, temperatura y producción de ácido-álcali

Las rizobacterias mostraron diferentes gamas de tolerancia a la concentración de NaCl. Las cepas ME01, RmBorbollón y Med mostraron ser tolerantes a todas las concentraciones probadas, mientras que Nod2rojo y ES1 resultaron poco tolerantes a la salinidad. El resto de los aislados creció entre 0.01 y 1 % de NaCl. En cuanto a la temperatura, todas las cepas crecieron entre 11°C y 35°C. Particularmente las cepas ME01 y RmBorbollón crecieron a 40 °C, mientras que la Alf creció abundante a 5 °C. Siete cepas produjeron ácido y tres cepas produjeron álcali (Tabla 1). En general, las cepas con amplia tolerancia a la salinidad también mostraron amplia tolerancia a la temperatura.

Producción de HCN, sideróforos y disolución de fosfatos

De las diez cepas solo la ES1 produjo HCN, representando el 10 % de la muestra. El 50 % de las cepas ensayadas mostraron liberación de sideróforos, destacando entre ellas la cepa Alf (Tabla 2 y las figuras suplementarias Figura 1a y Figura 1b). Por otra parte, el 100 % de las cepas creció en medio manitol indicando que todas son fijadoras de nitrógeno mientras que seis cepas (60 %) mostraron capacidad disolvente de fosfatos en el medio MM con fosfato tricálcico como fuente de P (Tabla 2).

Producción de AIA

Cinco cepas utilizadas produjeron AIA de forma significativa ($P < 0.05$) con respecto al control (sin bacteria) en presencia de Trp, y con valores cercanos al control positivo Sp7. Los valores de AIA obtenidos por las cepas rizo-

Tabla 1. Caracterización fisiológica de las rizobacterias de acuerdo a la tolerancia a la salinidad, temperatura, y producción de ácido o álcali.

Cepas	NaCl (%)						Temperatura °C						Producción de ácido o álcali
	0.01	0.1	1	1.5	2	2.5	5	11	27	30	35	40	
ME01	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	ácido
Leu2A	+	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+	-	álcali
Nod2rojo	+	+	-	-	-	-	-	+/-	+	+	+	-	álcali
RmBorbollón	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	ácido
CP	+	+	+	+/-	-	-	+/-	+	+	+	+	+/-	ácido
Med	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	-	ácido
YE1	+	+	+	-	-	-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	álcali
ES1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	ácido
EV1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	ácido
Alf	+	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	-	ácido

Media de tres réplicas: + Abundante crecimiento +/- Escaso crecimiento - Ausencia de crecimiento.

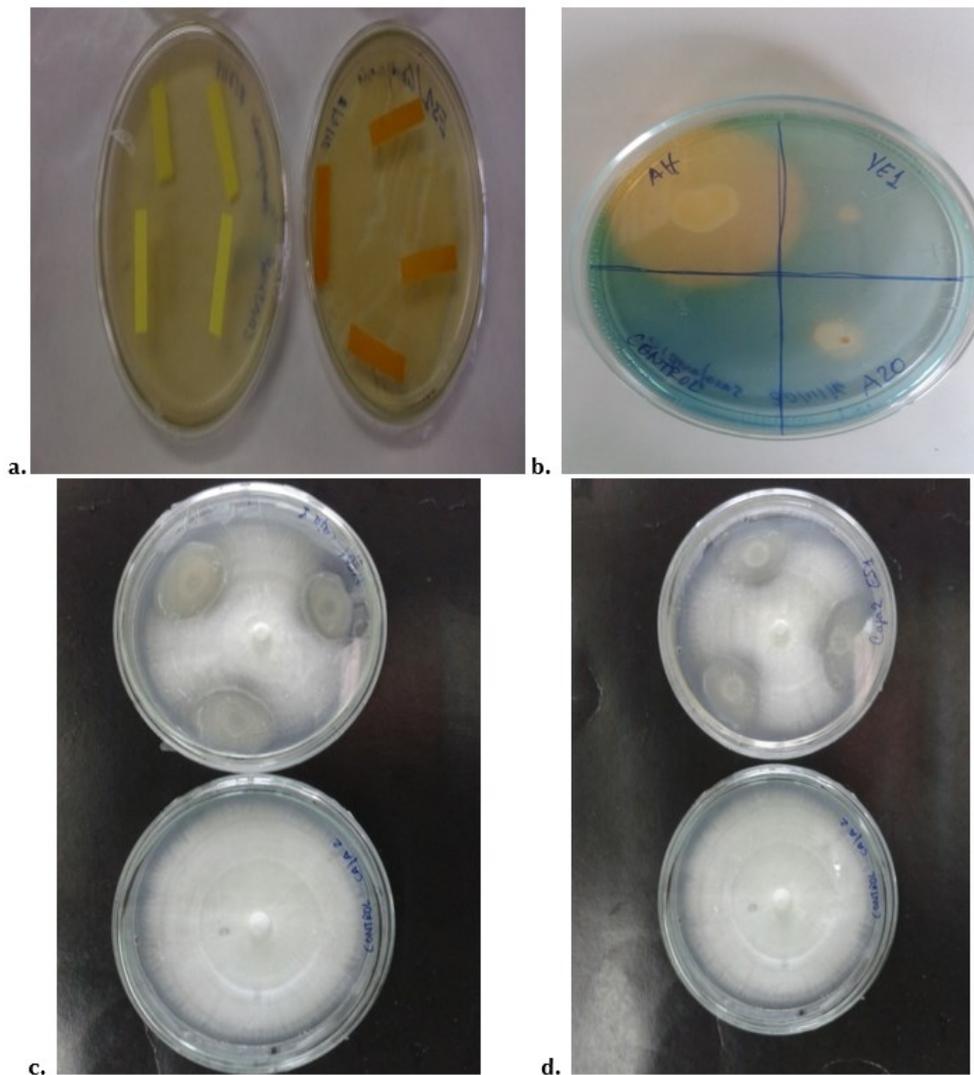


Figura 1. Pruebas de HCN, sideróforos y antagonismo. a. Viraje de color de la tira de papel filtro por la producción de HCN por ES1 a las 48 h de crecimiento b. Producción de sideróforos por las cepas Alf y YE1. c. ME01 Vs. *F. oxysporum* a los 8 días de crecimiento. d. ES1 Vs. *F. oxysporum* a los 8 días de crecimiento.

Tabla 2. Caracterización bioquímica de las rizobacterias según la producción de HCN, sideróforos, fijación de nitrógeno y disolución de fosfatos.

Cepas	Producción de HCN	Producción Sideróforos	de	Crecimiento en medio Manitol a los 6 días de siembra	Disolución de fosfatos a los 6 días de siembra		
					Formación de halo de disolución	de	Diámetro del halo de disolución (cm)
ME01	-	-		+	+		1.00
Leu2A	-	+		+	-		0
Nod2rojo	-	-		+	+		1.13
RmBorballón	-	-		+	+		1.06
CP	-	+		+	+		1.07
Med	-	+		+	-		0
YE1	-	+		+	-		0
ES1	+	-		+	+		1.07
EV1	-	-		+	+		1.00
Alf	-	++		+	-		0

Media de tres réplicas. +: indica crecimiento o producción según el caso ++: indica alta producción -: indica ausencia de crecimiento o producción según el caso.

Tabla 3. Evaluación del crecimiento (cm) del fitopatógeno frente al biocontrolador y porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de los hongos ensayados frente a los distintas cepas de rizobacterias, a los siete días de enfrentamiento.

Cepas rizobacterianas	Crecimiento radial (cm) del fitopatógeno y porcentaje de inhibición de su crecimiento frente al biocontrolador					
	<i>F. oxysporum</i> (cm)	Inhibición (%)	<i>C. gloeosporioides</i> (cm)	Inhibición (%)	<i>R. solani</i> (cm)	Inhibición (%)
ME01	1.06 ± 0.11 a	65	1.93 ± 0.11 ab	11	2.83 ± 0.28 abc	0
RmBorballón	1.16 ± 0.15 ab	61	2.63 ± 0.28 f	0	3.16 ± 0.28 de	0
Nod2rojo	1.30 ± 0.20 abc	57	2.20 ± 0.17 bcd	0	3.43 ± 0.11 ef	0
Alf	1.33 ± 0.20 abc	56	1.70 ± 0.0 a	22	3.0 ± 0.0 bcd	0
Leu2A	1.36 ± 0.32 abc	55	2.46 ± 0.15 cdef	0	3.53 ± 0.15 f	0
EV1	1.46 ± 0.25 bcd	51	2.26 ± 0.25 bcde	0	2.96 ± 0.05 bcd	0
YE1	1.50 ± 0.20 bcd	50	2.46 ± 0.25 cdef	0	3.0 ± 0.0 bcd	0
Med	1.66 ± 0.28 cd	45	2.60 ± 0.36 ef	0	2.73 ± 0.05 ab	0
ES1	1.80 ± 0.43 d	40	2.23 ± 0.25 bcd	0	2.60 ± 0.17 a	5
CP	3.00 ± 0.10 e	0	2.53 ± 0.05 def	0	3.06 ± 0.40 cd	0
Control	3.00 ± 0.0 e	0	2.17 ± 0.15 bc	0	2.73 ± 0.05 ab	0

Media de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas para ANOVA con un (P < 0.05). Control= Fitopatógeno sin microorganismo biocontrolador. N=3.

bacterianas estuvieron entre 18,07 µg.mL⁻¹ para la cepa Leu2A y 52,28 µg.mL⁻¹ para la cepa YE1, esta última mostró una producción altamente significativa (Figura 2). Ninguna cepa fue capaz de producir AIA en ausencia de Trp.

Antagonismo de rizobacterias contra fitopatógenos:

Las cepas ensayadas inhibieron significativamente el crecimiento de *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides* (P < 0.05). Nueve de las diez cepas resultaron antagonistas de *F. oxysporum* inhibiendo por encima del 40 % el cre-

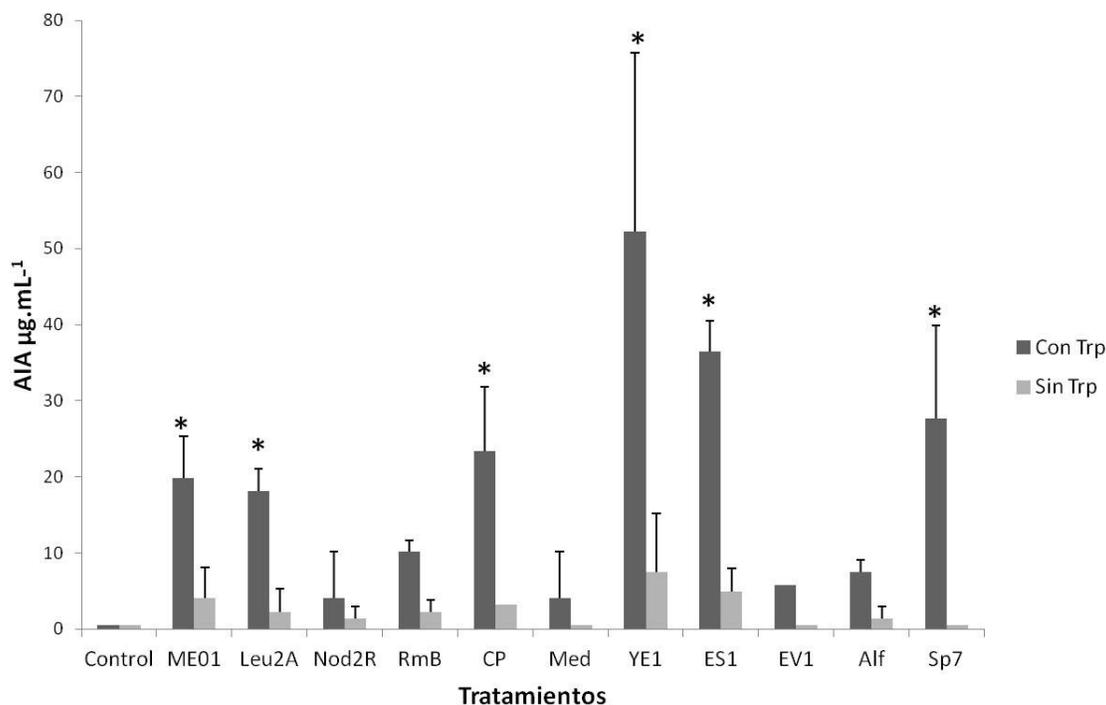


Figura 2. Producción de AIA por las rizobacterias en presencia y ausencia de triptófano. * Indica diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al tratamiento control con la prueba de Kruskal Wallis. $N=3$. Sp7= cepa control productora de AIA *Azospirillum brasilense*; Control= Solución NaCl 0.89 %; Tratamientos= Solución NaCl 0.89 % + cepa; Trp= triptófano.

cimiento del hongo. La cepa ME01 mostró el mayor potencial como biocontrolador tras inhibir el crecimiento del fitopatógeno *F. oxysporum* en 65 % (Tabla 3 y las figuras suplementarias Figura 1c y Figura 1d), y tender a inhibir a *C. gloeosporioides* en 11 %. Por su parte, la cepa Alf fue la única que inhibió significativamente ($P < 0.05$) el crecimiento de *C. gloeosporioides* en 22 %. Ninguna cepa inhibió el crecimiento de *R. solani* (Tabla 3).

DISCUSIÓN

En este estudio se demuestra el gran potencial que tienen las rizobacterias, especialmente los rizobios como posibles biofertilizantes y biocontroladores, además de su uso bien conocido en simbiosis con plantas leguminosas para la fijación biológica del N, pues las pruebas aquí utilizadas representan la mayoría de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal que presentan los microorganismos del suelo (Vessey, 2003; Antoun, 2012). La caracterización fisiológica de las rizobacterias permite discernir entre las que crecen en amplio rango

de condiciones ambientales y las que no, para seleccionarlas como posibles inoculantes y ser probadas en campo de acuerdo a las características que presenten.

La capacidad disolvente de fosfatos reside en la producción de ácidos orgánicos que hacen disponible el P para las plantas (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010). Principalmente estos ácidos orgánicos han sido descritos como ácido glucónico y ácido cítrico para el caso de bacterias y hongos, mientras que para las bacterias, también se ha mencionado el mecanismo de extrusión de protones (Reyes *et al.*, 1999). Estos mecanismos explican la disolución de fosfatos de calcio mostrada por seis cepas en nuestro ensayo.

El proceso de oxidación de la glucosa a ácido glucónico podría considerarse como una estrategia competitiva para transformar las fuentes de carbono disponibles en productos que pueden utilizar con menos facilidad otros microorganismos (Goldstein, 1995). La fijación biológica de nitrógeno es fundamental dentro del grupo de rizo-

bios, y convierte a estos simbioses facultativos en un grupo exitoso del suelo, gracias a que pueden tener un metabolismo versátil (heterotrofia variable, respiración aeróbica, microaeróbica y anaeróbica), que permite usar estos microorganismos como promotores del crecimiento vegetal no solo en legumbres sino en cereales y otros cultivos (Iyer y Rajkumar, 2018).

La prueba fisiológica de producción de HCN, difirió de la obtenida en otras investigaciones en donde entre el 22 % y el 33 % de la población microbiana analizada, perteneciente a géneros bacterianos no rizobiales, fue capaz de producir este compuesto volátil (Dinesh *et al.*, 2015; Aliyat *et al.*, 2020). La producción de metabolitos de bajo peso molecular como el HCN inhibe el transporte de electrones y, por lo tanto, la interrupción del suministro de energía a las células (Gopalakrishnan *et al.*, 2015). De esta manera, la cepa ES1 no solo podría ejercer un efecto biocontrolador sobre fitopatógenos, sino también sobre pastos que se consideren malezas, tal como el metabolito producido por *Pseudomonas* sp. como lo indicaron Pacheco-Hernández *et al.* (2015).

Asimismo, la cepa ES1 del orden rizobial fue capaz de cometabolizar fungicidas carbamatos en presencia de una fuente de carbono (Blanco *et al.*, 2013), pudiendo utilizarse esta cepa como biofertilizante, biorremediador y biocontrolador potencial, por su capacidad de disolución de fosfatos naturalmente bajo condiciones de estrés, como lo reportaron Anzuay *et al.* (2017), quienes demostraron que algunas cepas rizobacterianas de *Serratia* sp., *Pantoea* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., y *P. fluorescens* son capaces de disolver fosfatos en presencia de pesticidas, y su tolerancia a altas temperaturas y altas concentraciones de NaCl, como fue evaluado en la presente investigación.

Los valores de AIA mayores a 18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, fueron similares a los producidos en aislados provenientes de nódulos de leguminosas y suelo rizosférico por Mota *et al.* (2014) y en cepas no rizobiales por Boukaya *et al.* (2018) y Márquez *et al.* (2020). Estos valores indican que las cepas rizobiales Leu2A, ME01, CP, ES1 y YE1 tienen potencial para ser usadas como bioestimulantes del crecimiento vegetal en campos cultivados, y que a nivel de umbráculo también pueden ser efectivas como lo demostraron Blanco *et al.* (2018) con plántulas de

pimentón y lechuga usando estas cepas de rizobios de forma individual, y Castro y Blanco (2018) y Blanco *et al.* (2021) aplicando consorcios de estas cepas en plantas de pimentón y en plántulas de cebolla, respectivamente. El ácido indol acético es la fitohormona que acelera el crecimiento vegetal y mejora el desarrollo de la raíz, brotes y el vigor de las plántulas; está involucrado en la división celular, la diferenciación de los haces vasculares y es esencial en la formación del nódulo (Gopalakrishnan *et al.*, 2015).

La capacidad antagónica de algunos géneros microbianos radica principalmente en la producción de moléculas tóxicas, la competencia por nutrientes y espacio, y la alteración de la fisiología de la planta hospedadora en beneficio de su población, lo que permite mantener el equilibrio poblacional (Palaniyandi *et al.*, 2011). Los sideróforos producidos por las BPCV pueden ejercer un efecto biocontrolador además de biofertilizante, debido a que privan del hierro a fitopatógenos y limitan el crecimiento de estos, constituyendo así un mecanismo de competencia por el ión férrico. En la presente investigación varios géneros de rizobios resultaron positivos para la producción de sideróforos, y en la cepa Alf (*Pseudomonas fluorescens*) se observó la mayor producción de estos quelantes, así como en el estudio de Aliyat *et al.* (2020), en donde cepas del género *Pseudomonas* mostraron muy alta producción de sideróforos.

Los rizobios son también conocidos como agentes importantes de biocontrol de patógenos en ecosistemas naturales y agrícolas (Mourad *et al.*, 2009; Volpiano *et al.*, 2019). En el presente estudio, se encontró que las cepas rizobiales ME01 (*Rhizobium tropici*), RmBorbollón (*Sinorhizobium* spp.), Leu2A y Nod2rojo (*Bradyrhizobium japonicum*) inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* por encima de un 50 %, al igual que los resultados obtenidos por Antoun *et al.* (1998) donde 49 cepas de *Sinorhizobium meliloti* inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* hasta en un 50 %. A su vez la cepa Alf (*Pseudomonas fluorescens*) inhibió el crecimiento tanto de *F. oxysporum* como de *C. gloeosporioides*, mostrando así un rango de biocontrol más amplio.

La eficiencia antagónica de estos y otros géneros rizobacterianos contra hongos fitopatógenos es generalmente

mediada por uno o más mecanismos, como la producción de sustancias antimicrobianas, competición por nutrientes debido a la producción de sideróforos, bloqueo de sitios de entrada o activación de mecanismos de defensa del hospedador, y producción de enzimas quitinolíticas, sustancias volátiles, y endoglucanasas (Aysan y Demir, 2009; Márquez *et al.*, 2020; Galeano *et al.*, 2020), por lo que este efecto puede deberse a un pool de mecanismos implicados en el biocontrol de fitopatógenos.

CONCLUSIONES

La mayoría de las rizobacterias evaluadas mostraron un efecto antagónico contra dos de los fitopatógenos evaluados de importancia agrícola por encima del 50 % de inhibición. La naturaleza biocontroladora de estas bacterias además se comprobó mediante otros mecanismos evaluados como la producción de sideróforos y HCN. Las rizobacterias también mostraron potencial como promotoras del crecimiento vegetal a través de los mecanismos de fijación de nitrógeno, disolución de fosfato, y producción de AIA. De esta forma se destacó el potencial que tienen las cepas rizobiales ES1, ME01, Leu2A, y YE1, y la cepa Alf de *Pseudomonas fluorescens* para incrementar la fertilidad del suelo, promover el crecimiento de las plantas, y suprimir enfermedades con fines de producción de bioinsumos en la agricultura sostenible. Se recomienda evaluar consorcios de estas cepas para potenciar sus efectos benéficos en cultivos de interés agrícola.

AGRADECIMIENTOS

Al CDCHTA-ULA por el financiamiento del proyecto C-1890-14-01-C. A Roberto Skwierinski†, y Robert Márquez del Laboratorio de Fitobiotecnología-ULA por sus aportes metodológicos en este trabajo, a Christian Carrero† y Kleira Quintero del IIAP-ULA por facilitarnos gentilmente las cepas fitopatógenas, y a Argenis Sánchez de la UNET por la colaboración recibida para esta investigación. Y. Castro agradece a la Coordinación de la formación del personal de nivel superior (CAPES) en Brasil por el apoyo financiero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrios, G.N. (2005). Fitopatología. Segunda edición. México. Editorial Limusa. 838 p.

Alcedo, Y., & Reyes, I. (2018). Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria*

alternata en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Bio-agro*. 30(1): 59-66.

Aliyat, F.Z., Maldani, M., El Guilli, M., Nassiri, L., & Ibjijjen, J. (2020). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from phosphate solid sludge of the moroccan phosphate mines. *The Open Agriculture Journal*. 14: 16-24.

Antoun, H., Beauchamp, Ch., Goussard, N., Chabot, R., & Ladande, R. (1998). Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*. 204: 57-67.

Antoun, H. (2012). Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Engineering*. 46: 62-67.

Anzuay, M.S., Ruiz Ciancio, M.G., Ludueña, L.M., Angelini, J.G., Barros, G., Pastor, N., & Tauriana, T. (2017). Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants by single and mixed cultures of efficient phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. *Microbiological Research*. 199: 98-109.

Avendaño, C., Arbeláez, G., & Rondón, G. (2006). Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* en frijol *Phaseolus vulgaris*, mediante la acción combinada de *Entrophospora colombiana*, *Trichoderma* sp., y *Pseudomonas fluorescens*. *Agronomía Colombiana*. 24: 62-67.

Aysan, E., & Demir, S. (2009). Using Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Rhizobium leguminosarum* Biovar phaseoli against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Pathology Journal*. 8(2): 74-78.

Bagg, A., & Neilands, J.B. (1987). Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiological Reviews*. 51: 509.

Bakker, A.W. & Schippers, B. (1987). Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology & Biochemistry*. 19: 451-457.

Bhattacharyya, P.N., & Jha, D.K. (2012). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(4):1327-1350.

- Blanco, E.L., Marquina, M.E. & Castro, Y. (2013). Respuestas a la aplicación de carbamatos en dos aislados rizobianos provenientes de Mucuchíes, Estado Mérida, Venezuela. *Bioagro*. 25(2): 117-128.
- Blanco, E.L., Castro, Y., Olivo, A., Skwierinski, R. & Moronta Barrios, F. (2018). Germinación y crecimiento de plántulas de pimentón y lechuga inoculadas con rizobios e identificación molecular de las cepas. *Bioagro*. 30(3): 207-218.
- Blanco, E.L., Rada, F., Castro, Y., & Paolini, J. (2021). Selección de un consorcio microbiano promotor del crecimiento de plántulas de cebolla en condiciones de umbráculo. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 38(2): 301-321.
- Boukaya, N., Goudjal, Y., Zamoum, M., Chaabane, C., Sabaou, N., Mathieu, F., & Zitouni, A. (2018). Biocontrol and plant-growth-promoting capacities of actinobacterial strains from the Algerian Sahara and characterization of *Streptosporangium becharense* SG1 as a promising biocontrol agent. *Biocontrol Science and Technology*. 28(9): 858-873.
- Bric, J.M., Bostock, R.M. & Silverston, S.E. (1991). Rapid *in situ* assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on nitocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(2): 535-538.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Perú. 62 p.
- Castro, Y., & Blanco, E.L. (2018). Estimación del contenido de clorofila y nitrógeno en plantas de pimentón inoculadas con bacterias rizosféricas. *Revista Científica UNET* 30(1): 105-112.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, 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: 4951-4959.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Kundil, Y., Purayil, K., & Aravind, R. (2015). Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological Research*. 173: 34-43.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Brock, A., & Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*. 212: 155-164.
- Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Requena, M.E., Ahmed, A.S., & Candela, M.E. (2004a). Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*. 26: 61-68.
- Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Requena, M.E., Rubio, L., & Candela, M.E. (2004b). Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*. 26: 69-78.
- Ferrera, R., González, M., & Rodríguez, M. (1993). Manual de Agromicrobiología. Edit. Trillas. Méjico. 139 p.
- Fravel, D., Olivain, C., & Alabouvette, C. (2003). Research review *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*. 157: 493-502.
- Galeano, N.F., Marulanda, S., Padilla, B.E., Mantilla, J.G., Ceballos, N., & Restrepo, G.M. (2020). Antagonism of plant growth promoting rhizobacteria against the causal agent of the vascular wilting of tomato. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 22(2): 35-43.
- Glickmann, E., & Desauxx, Y. (1995). A Critical Examination of the Specificity of the Salkowski Reagent for Indolic Compounds Produced by Phytopathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (2): 793-796.
- Goldstein, A.H. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*. 12: 185-193.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R.K., Laxmipathi Gowda, C.L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. 3 *Biotech*. 5: 355-377.
- Hernández, A., Rives, N., Caballero, A., Hernández, A.N., & Heydrich, M. (2004). Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo de maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 6(1): 6-13.
- Holt, J.G., & Krieg, N.R. (1994). Enrichment and isolation. In Gerhart P. Murray RGE. Wood WA. Krieg NR (Eds.) *Methods for general and molecular biology*. Ch. 8. ASM. Washington. DC, EEUU. Pp. 179-212.

- Iyer, B., & Rajkumar, S. (2018). Rhizobia, In *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13104-8>.
- Kundan, R., Pant, G., Jadon, N., & Agrawal, P.V. (2015). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism and Current Prospective. *Journal of Fertilizers & Pesticides*. 6(2): 155.
- Marquina, M.E., González, N.E. & Castro, Y. (2011). Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*. 59(3): 1017-1036.
- Márquez, R., Blanco, E.L., & Aranguren, Y. (2020). *Bacillus* strain selection with plant growth-promoting mechanisms as potential elicitors of systemic resistance to gray mold in pepper plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 27: 1913–1922.
- Meldau, D.G., Meldau, S., Hoang, L.H., Underberg, S., Wünsche, H., & Baldwin, I.T. (2013). Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium *Bacillus* sp. B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition. *Plant Cell*. 25 (7): 2731 -2747.
- Mondino, P., & Vero, S. (2006). Control biológico de patógenos en plantas. Editorial Facultad de Agronomía Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Pp. 158.
- Montgomery, D. (1991). Diseño y análisis de experimentos. Editorial Iberoamericana. 541 p.
- Mota, E., Mangrich, J., Primieri, S., Machado, B., Pigozzi, L., Chibilski, E., Schweitzer, D., Dalla, M., & Dobler, M. (2014). Obtenção de bactérias produtoras de ácido indol-3-acético. 4º *Seminário de Pesquisa, Extensão e Inovação do IFSC*. https://www.researchgate.net/publication/266078210_Obtencao_de_bacterias_produtores_de_acido_indol-3-acetic. Consultado en enero 2020.
- Mourad, K., Fadhila, K., Chahinez, M., Meriem, R., Philippe, L., & Abdelkader, B.(2009). Antimicrobial activities of *Rhizobium* sp. strains against *Pseudomonas savastanoi*, the agent responsible for the olive knot disease in Algeria. *Grasas y aceites*. 60(2): 139 – 146.
- Pacheco-Hernández, X.J., Rodríguez-Dorantes, A., González-Rivera, R., Amora-Lazcano, E., Guerrero-Zúñiga, L.A., & Rodríguez-Tovar, A.V. (2015). Evaluación del efecto fitotóxico de rizobacterias deletéreas sobre el crecimiento radical de *Axonopus affinis* (chase) y *Lens esculenta* (moench). *Polibotánica*. 40: 137-152.
- Palaniyandi, S.A., Yang, S.H., Cheng, J.H., Meng, L., & Suh, J.W. (2011). Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in yam by *Streptomyces* sp. MJM5763. *Journal of Applied Microbiology*. 111(2): 443-455.
- Reyes, I., Bernier, L., Simard, R., & Antoun, H. (1999). Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology*. 28: 281-290.
- Paredes – Mendoza, M., & Espinosa – Victoria, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*. 28: 61-70.
- Schwyn, B., & Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160: 47–56.
- Volpiano, C.G., Lisboa, B., Granada, C., Sao José, J., De Oliveira, A., Beneduzi, A., Perevalova, Y., Passaglia, L., & Vargas, L. (2019). Rhizobia for Biological Control of Plant Diseases. In *Microbiome in Plant Health and Disease*. V. Kumar et al. (eds.). Springer Nature Singapore. Pp. 315-336. doi.org/10.1007/978-981-13-8495-0_14.
- Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
- Vincent, J.M. (1975). Manual práctico de rizobiología. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. 74 p.
- Wei, G., Kloepper, J.W., & Tuzun, S. (1991). Induction of systemic resistance of *Cucumber* to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Phytopathology*. 81(12): 1508-1512.
- Xue, Ch., Penton, C.R., Shen, Z., Zhang, R., Huang, Q, Li, R., Ruan, Y., & Shen, Q. (2015). Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. *Scientific Reports*. 5: 11124.