

## EFECTO ANTAGÓNICO *IN VITRO* DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CEPA PSS CONTRA AISLAMIENTOS DE *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* Y *DICKEYA CHRYSANTHEMI*

Marusia Stefanova Nalimova,<sup>1</sup> Yuliet Franco Cardoza,<sup>1</sup> María F. Coronado Izquierdo<sup>1</sup> y Pilar M. Villa Gómez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no.514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

<sup>2</sup> Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, Ciudad de La Habana

Las pudriciones blandas causadas por las bacterias pectolíticas son responsables de considerables pérdidas económicas en diversos cultivos. A nivel mundial se estiman entre 50 y 100 millones de dólares por año solamente en el cultivo de la papa [Matlala, 2004]. En las condiciones de Cuba las especies *Pectobacterium carotovorum* [Gardan *et al.*, 2003] (sin. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* [Jones, 1901] y *Dickeya chrysanthemi* [Samson *et al.*, 2004] (sin. *Erwinia chrysanthemi* [Burkholder *et al.*, 1953], pertenecientes a estas bacterias, son causantes de la podredumbre blanda en la planta y en los tubérculos en el campo y el almacén [Stefanova, 1990].

Con el propósito de disminuir la incidencia en el campo, en todos los países se utilizan diversas medidas de manejo, entre ellas el uso de semillas sanas, variedades resistentes y medidas culturales. El control biológico con antagonistas se ha investigado y valorado como un método potencial para el control de las pudriciones blandas bacterianas en diferentes cultivos, principalmente en la papa [Geels y Schippers, 1983; Colyer y Mount, 1984; Rhodes y Logan, 1986; Tzeng *et al.*, 1990; Lucan y Melo, 1999, Abdel-Alim *et al.*, 2000].

La eficacia de la cepa PSS, perteneciente de la especie *Pseudomonas aeruginosa*, y del producto biológico obtenido a partir de ella, se ha comprobado tanto en condiciones controladas como en el campo contra diversas especies fúngicas, entre ellas el tizón temprano de la papa, causado por *Alternaria solani* [Rodríguez y Stefanova, 2005]; sin embargo, se desconoce el efecto que pueden tener contra las bacterias fitopatógenas

registradas en este cultivo. En el presente estudio se evaluó la sensibilidad de aislamientos de *D. chrysanthemi* y *P. carotovorum* causantes de pudrición blanda en papa frente a los metabolitos producidos *in vitro* por la cepa PSS.

La siembra se realizó en placas de Petri, en forma de manchas de igual tamaño (1,2 x 1,2 cm) en tres puntos equidistantes sobre los medios de cultivo King B (KB) [King *et al.*, 1954] y agar nutriente (AN). La incubación se realizó a 27°C (± 1°C) durante 48 h para la variante KB y 96 para la AN. Pasado el tiempo indicado, se retiró el crecimiento bacteriano y las placas expuestas a los vapores de cloroformo por 10 min, según Abdel-Alim *et al.* (2000). Las bacterias fitopatógenas se sembraron de la misma forma en el lugar del antagonista eliminado, y se evaluó su crecimiento en comparación con las placas testigos. Se estudió la sensibilidad de ocho aislamientos de *D. chrysanthemi* y 13 de *P. carotovorum* –21 en total– tomados del cepario del laboratorio. Por cada uno de los aislamientos patógenos se realizaron dos montajes con dos placas de cada medio de cultivo.

El 75% de los aislamientos pertenecientes a *D. chrysanthemi*, y el 23% de las de *P. carotovorum*, resultaron sensibles. Las cepas B30, B16 y Q34 de la primera especie no crecieron en ninguna de las variantes tratadas, con una marcada susceptibilidad frente a los sideróforos y a los bactericidas, segregados en el medio KB y AN respectivamente. Los resultados confirman el efecto bacteriostático y bactericida de la cepa PSS, expresado en la reducción y en la ausencia total del

crecimiento bacteriano de las cepas estudiadas. En todos los casos se observó una sensibilidad mayor frente a los metabolitos de tipo sideróforos (Tabla 1). En este caso se trata de Pioverdin tipo II, segregado por la cepa PSS [Villa *et al.*, 2002]. Los sideróforos se forman bajo condiciones limitadas de hierro trivalente, como es el caso del medio KB [Wipps, 2001], con producción de competencia por este elemento vital a favor del antagonista.

La potencialidad de bacterias asociadas a las plantas que ejercen el biocontrol mediante la síntesis de diversos metabolitos, entre ellos antibióticos y sideróforos, está reconocida a nivel mundial [Leong, 1986; Blumer y Haas, 2000; Compant *et al.*, 2005]. Numerosas bacterias endofíticas, que incluyen cepas de *Pseudomonas* sp., *Curtobacterium luteum* y *Pantoea agglomerans*, resulta-

ron promisorias para las erwinias pectolíticas [Sturz *et al.*, 1999; Reiter *et al.*, 2002]. Recientemente una nueva forma de biocontrol, que desactiva la virulencia de *E. carotovora*, se ha descrito para la especie *Bacillus thuringiensis* [Dong *et al.*, 2004], bacteria reconocida por su efecto insecticida.

El producto comercial obtenido a partir de la rizobacteria *Pseudomonas aeruginosa*, cepa PSS mediante procesos biotecnológicos establecidos, está constituido por sideróforos del tipo pioverdin II, antimicrobianos de naturaleza fenólica y ácido salicílico [Villa *et al.*, 2002]. Los resultados *in vitro* en este trabajo sugieren ampliar las pruebas con el bioproducto para el control de la podredumbre blanda en tubérculos y plantas de papa.

**Tabla 1. Reducción del crecimiento e los aislamientos sensibles de *Pectobacterium carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi* frente a los metabolitos de la cepa PSS**

| Especie                | Cepa  | KB<br>Crecimiento bacteriano (cm) |             |               | AN<br>Crecimiento bacteriano (cm) |             |               |
|------------------------|-------|-----------------------------------|-------------|---------------|-----------------------------------|-------------|---------------|
|                        |       | Testigo                           | Tratamiento | Reducción (%) | Testigo                           | Tratamiento | Reducción (%) |
| <i>P. carotovorum</i>  | Art41 | 1,8                               | 0,69        | 60            | 1,1                               | 1,0         | 8,2           |
| <i>P. carotovorum</i>  | E805  | 1,8                               | 1,0         | 43,8          | 1,3                               | 1,2         | 8,1           |
| <i>P. carotovorum</i>  | E10   | 1,8                               | 0,63        | 65,6          | 1,2                               | 1,09        | 10,9          |
| <i>D. chrysanthemi</i> | B16   | 2,5                               | 0           | 100           | 1,2                               | 0           | 100           |
| <i>D. chrysanthemi</i> | B14   | 2,3                               | 1,12        | 50,4          | 1,2                               | 1,1         | 5,6           |
| <i>D. chrysanthemi</i> | B30   | 2,5                               | 0           | 100           | 1,2                               | 0           | 100           |
| <i>D. chrysanthemi</i> | E1105 | 1,8                               | 1,03        | 42,7          | 1,1                               | 1,06        | 5,75          |
| <i>D. chrysanthemi</i> | E1005 | 1,8                               | 0,46        | 74,1          | 1,2                               | 1,0         | 134           |
| <i>D. chrysanthemi</i> | Q34   | 1,3                               | 0           | 100           | 1,1                               | 0           | 100           |

## REFERENCIAS

- Abdel-Alim, A. I.; P. Laux; W. Zeller: «Biocontrol of the Soft Rot Pathogens (*Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*) with Antagonistic Bacteria», Grupo de trabajo de lucha biológica contra enfermedades de plantas. Extractos de la conferencia 2000 [http://dpg-bcpc-symposium.de/fileadmin/alte\\_Webseiten/ak/02/tagung2000.htm#1](http://dpg-bcpc-symposium.de/fileadmin/alte_Webseiten/ak/02/tagung2000.htm#1) (consultado en el 2007).
- Blumer, C.; D. Haas: «Mechanism, Regulation, and Ecological Role of Bacterial Cyanide Biosynthesis», *Arch. Microbiol* 173:170-177, 2000.
- Burkholder, W. H.; L. A. McFadden; A. W. Dimock: «A Bacterial Blight of Chrysanthemums», *Phytopathology* 43:522-526, 1953.
- Colyer, P. D.; M. S. Mount: «Bacterization of Potatoes with *Pseudomonas putida* and Its Influence on Post Harvest Soft Sot Diseases», *Plant Disease* 67:703-706, 1984.
- Compant, S.; B. Duffy; J. Nowak; C. Clement; E. A. Barka: «Use of Plant Growth Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects», *Applied and Environmental Microbiol.* 71 (9):4951-4959, 2005.
- Dong, Y. H.; X. F. Zhang; J. L. Xu; L. J. Zhang: «Insecticidal *Bacillus thuringiensis* Silences *Erwinia carotovora* Virulence by a New Form of Microbial Antagonism Signal Interference», *Appl. Environ Microbiol.* 70 (2):954-960, 2004.
- Geels, F. P.; B. Schppers: «Reduction of Yield Depressions in High Frequency Potato Cropping Soil After Seed Treatments with Antagonistic Fluorescent *Pseudomonas* spp.», *Phytopathologische Zeitschrift* 108:207-214, 1983.
- Jones, L. R.: «*Bacillus carotovorus* n. sp., die Ursache ciner weichen Fäulnis der Möhre», *Zbl. Bakt. Abt 2* 7:12-21 and 61-8, 1901.
- King, E. O.; M. K. Ward; D. E. Raney: «Two Simple Media for the Demonstration of Pyocyanine and Fluorescin», *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307, 1954.
- Leong, J.: «Siderophores: Their Biochemistry and Possible Role in the Biocontrol of Plant Pathogens», *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:187-209, 1986.

### *Efecto antagónico in vitro de Pseudomonas...*

- Lucan, C. M. M.; I. S. de Melo: «Seleção de rizobacterias antagônicas a *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica*, em tubérculos de batata», *Summa Phytopathologica* 25:132-136, 1999.
- Matlala, K.: Epidemiology and detection of *Erwinia* spp on potatoes, <http://www.up.ac.za/academic/microbio> (consultado en enero del 2004).
- Reiter, B.; U. Pfeifer; H. Schwab; A. Sessitsch: «Response of Endophytic Bacterial Communities in Potato Plants to Infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*», *Appl. Environ Microbiol.* 68 (5):2261-2268, 2002.
- Rhodes, D. J.; C. Logan: «Effects of Fluorescent *Pseudomonas* on Potato Blackleg Syndrome», *Annual of Applied Biology* 108:511- 518, 1986.
- Rodríguez, F.; M. Stefanova: «Control biológico del tizón temprano (*Alternaria solani*) en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en condiciones de campo», *Fitosanidad* 9 (4):35-37, 2005.
- Stefanova, M: «Lista de bacterias fitopatógenas de Cuba», Cidisav, Inisav, La Habana, 1990.
- Sturz, A. V.; B. R. Christie; B. G. Matheson; W. J. Arsenault; N. A. Buchanan: «Endophytic Bacterial Communities in the Periderm of Potato Tubers and Their Potential to Improve Resistance to Soil-Borne Plant Pathogens», *Plant Pathology* 48:360-369, 1999.
- Tzeng, K.; R. G. McGuire; A. Kelman: «Resistance of Tubers from Different Potato Cultivars to Soft Rot Caused by *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica*», *American Potato Journal* 67:287-305, 1990.
- Villa, P.; M. E. Díaz de Villegas; M. Stefanova; G. Michelena; J. Rodríguez; I. Gutiérrez; A. Frías: «Procedimiento de obtención de metabolitos antifúngicos de *Pseudomonas aeruginosa*, PSS por vía biotecnológica», Patente: Certificado no. 22 805 , CI no. 1079/2002, 18 de abril del 2002.
- Wipps, J. M.: «Microbial Interactions and Biocontrol in the Rhizosphere», *J. Exp.Bot.* 52:487-511, 2001.