

EVALUACIÓN DEL EFECTO FITOTÓXICO DE RIZOBACTERIAS DELETÉREAS SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL DE *AXONOPUS AFFINIS* (CHASE) Y *LENS ESCULENTA* (MOENCH)

EVALUATION OF PHYTOTOXIC EFFECT OF DELETERIOUS RHIZOBACTERIA ON THE ROOT GROWTH OF *AXONOPUS AFFINIS* (CHASE) AND *LENS ESCULENTA* (MOENCH)

**X.J. Pacheco-Hernández¹, A. Rodríguez-Dorantes¹, R. González-Rivera²,
E. Amora-Lazcano³, L.A. Guerrero-Zúñiga⁴, y A.V. Rodríguez-Tovar³**

¹Lab. Fisiología Vegetal, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

²Lab. Ecología Vegetal, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

³Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

⁴Instituto Mexicano del Petróleo, México, DF.

Correo electrónico: anrodo2000@hotmail.com

RESUMEN

Las malezas ocasionan una gran pérdida en las tierras agrícolas y comúnmente, las medidas de manejo y contención de estas especies se dan con la aplicación de herbicidas, sin embargo; en años recientes se ha presentado un interés en establecer mecanismos de biocontrol seguros, con el empleo de bacterias inhibidoras del crecimiento conocidas como rizobacterias deletéreas (*Deleterious rhizobacteria*: DRB) que se consideran generalmente como no parasíticas, y causan, de manera sutil, efectos deletéreos a través de la producción de metabolitos dañinos a las plantas. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar la producción de ácido cianhídrico de pseudomonas rizobacterianas de malezas de un cultivo de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y evaluar el efecto fitotóxico de éstas sobre el crecimiento radical de plántulas de *Axonopus affinis* (Chase) y *Lens esculenta*

(Moench). De acuerdo con los resultados obtenidos con relación a la evidencia de que los aislados de pseudomonadas son rizobacterias cianogénicas y de su efecto fitotóxico medido sobre las especies vegetales bajo estudio; se sugieren a éstas como posibles agentes de biocontrol con pastos que sean considerados malezas; ya que en general se observó que inhiben su crecimiento radical; sin embargo, un enfoque particular lo tiene la rizobacteria *Pseudomonas* sp. A52, la cual presentó no solamente actividad como una DRB sino también como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal; lo que la hace más importante de analizar en cuanto a su potencial y espectro de acción; tanto para malezas monocotiledóneas como para dicotiledóneas, recomendable como un posible agente de biocontrol con actividad múltiple.

Palabras clave: malezas, rizobacterias deletéreas, ácido cianhídrico, crecimiento radical.

ABSTRACT

Weeds are a group of plants that commonly generate a huge loss of land crops; the management strategies and contention of these plant species includes the application of herbicides, although in recently years, it is now an interest to the establishment of safety biocontrol mechanisms, with the employment of microorganisms for the weeds' management, one microbial group that has been employed is the *Deleterious rhizobacteria* (DRB), a non-parasitic rhizospheric bacteria that causes a subtle-deleterious effects on plants through the production of harmful metabolites. The aim of the present work was to characterize the cyanide production of rhizospheric pseudomonads isolated from weeds of alfalfa crop and evaluates their phytotoxic effect on the root growth of *Axonopus affinis* (Chase) and *Lens esculenta* (Moench) seedlings. According to the obtained results related with the evidence that the pseudomonads isolates were cyanogenic rhizobacteria and with their phytotoxic effect measured on the plant species under study, these rhizobacteria are recommended as biocontrol agents of grass weeds, because the inhibitory effect on *A. affinis* plantlets. Particular focus possess the *Pseudomonas* sp. A52 strain, because it presents not only activity as DRB, it has also activity as plant growth promoter, that makes to analyze this rhizobacteria regarding to its potential and action spectra for monocotyledonous and dicotyledonous weeds, and as a recommendable biocontrol agent with multiple activity.

Key words: weeds, deleterious rhizobacteria, cyanhidric acid, root growth.

INTRODUCCIÓN

Una ventaja principal del empleo de microorganismos para el control de malezas es que éstos pueden ser más selectivos que los herbicidas y menos dañinos al ambiente (Owen y Zdor, 2001). Las bacterias inhibidoras del crecimiento conocidas como rizobacterias deletéreas (*Deleterious rhizobacteria*: DRB) se consideran generalmente como no parasíticas, y causan en primera instancia efectos deletéreos a través de la producción de metabolitos dañinos que se absorben por las raíces (Kremer y Souissi, 2001; Schippers *et al.*, 1987; Suslow y Schroth, 1982), dentro de ellas, se han identificado como miembros a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Citrobacter*, y *Achromobacter* (Suslow y Schroth, 1982; Kremer *et al.*, 1990; Li y Kremer, 2000; Kennedy *et al.*, 2001; Daigle *et al.*, 2002; Stubbs y Kennedy, 2012). Como ejemplo de su aplicación se tiene el empleo de *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Enterobacter taylorae* para el control de *Bromus tectorum* L. (Mazzola *et al.*, 1995) y la aplicación de *Pseudomonas* spp. en campos de maíz para controlar a *Triticum hermonthica* (Del.) Benth. (Ahonsi *et al.*, 2002). Sin embargo, se considera que uno de los grupos principales de rizobacterias con potencial como agentes de control biológico son las pseudomonadas (Kremer and Kennedy, 1996; Mortensen, 1998); ya que se sabe que uno de los metabolitos secundarios producidos comúnmente por éstas es el ácido cianhídrico (HCN) un gas o compuesto volátil que se sabe afecta negativamente al metabolismo y crecimiento radical (Devi *et al.*, 2007; Schippers *et al.*, 1990). La producción de HCN se relaciona con la disponibilidad nutricional de los precursores de la vía; como son los aminoácidos glicina y metio-

nina, o de exudados radicales que contengan glucosidos cianogénicos (Owen y Zdor, 2001). El ácido cianhídrico no participa en el crecimiento, almacenamiento de energía o el metabolismo primario de las bacterias, pero generalmente se considera como un metabolito secundario que posee un papel ecológico y confiere una ventaja selectiva a las cepas que lo producen (Vining, 1990). La cianogénesis bacteriana se considera como parte de la capacidad de biocontrol de este tipo de cepas bacterianas que suprimen las enfermedades ocasionadas por hongos en algunas plantas de importancia económica (Blumer y Haas 2000; Siddiqui et al., 2006).

Sturz et al. (2001) encontraron que la estimulación del crecimiento vegetal por rizobacterias a través de la producción de metabolitos secundarios se puede interpretar como un efecto benéfico lateral alelopático (Hoagland, 2001), seguido de la competencia por un nicho entre las comunidades microbianas a partir de las que la planta se beneficia, aunque pasen inadvertidas. La introducción de bacterias en el suelo para el control de malezas, requiere que los organismos sobrevivan y se multipliquen bajo condiciones de campo. van Veen et al. (1997) han reportado que para que los microorganismos se consideren adecuados y exitosos como agentes de biocontrol de las plagas de plantas, se necesita que sean capaces de colonizar el suelo y las raíces (Gurley y Zdor, 2005).

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar la producción de ácido cianhídrico de pseudomonas rizobacterianas de malezas de un cultivo de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y evaluar el efecto fitotóxico de éstas sobre el crecimiento radical de plántulas de *Axonopus affinis* (Chase) y *Lens esculenta* (Moench).

MATERIAL Y MÉTODOS

Determinación de la producción de ácido cianhídrico por pseudomonas rizobacterianas de malezas

Se realizó la caracterización de la producción *in vitro* de ácido cianhídrico (HCN) de cinco pseudomonas provenientes del cepario del Laboratorio de Fisiología Vegetal; aisladas de la rizosfera de malezas de un cultivo de alfalfa (*Medicago sativa* L.), ubicado en el municipio de San Vicente Chicoloapan de Juárez, Estado de México: *Pseudomonas* sp. A11 y *Pseudomonas* sp. A12 aisladas de *Bidens odorata* (Cav), *Pseudomonas* sp. A21 y *Pseudomonas* sp. A22 aisladas de *Ipomea purpurea* L. (Roth), *Pseudomonas* sp. A52 aislada de *Eragrostis intermedia* (Hitchc) y *Pseudomonas* sp. A101 aislada de *Taraxacum officinale* (Weber). La evaluación de su producción se realizó empleando la técnica de sellado de placas descrita por Kremer y Souissi (2001), los aislados bacterianos se crecieron por estría masiva en placas con medio King B suplementado con 4.4g/L de glicina. Se impregnó papel Whatman núm. 1 de 9 cm de ϕ estéril con una solución de picrato (ácido pícrico al 0.5% en una solución de carbonato de sodio al 2%) que se depositó en el interior de la tapa de la cajas de Petri con el inóculo bacteriano respectivo; las cajas se cerraron con las tapas que contenían el papel filtro, se sellaron con Parafilm "M" para evitar la volatilización del HCN producido y se incubaron a 28°C por 48 horas. Después del tiempo de incubación se observó el cambio de color del papel con picrato (amarillo a café) que se consideró como evidencia de la producción de HCN. De acuerdo con la intensidad del cambio de color, se categorizó la producción según Sharma et al. (2011) como + amarillo-anaranjado; ++ anaranjado; +++ anaranjado-café; ++++ café; y +++++ café intenso.

Evaluación del efecto fitotóxico de los aislados rizobacterianos a través de la inhibición del desarrollo de plántulas de *Axonopus affinis* (Chase) y *Lens esculenta* (Moench)

Los bioensayos realizados para la evaluación del efecto inhibitorio por la producción de compuestos volátiles (HCN) de las pseudomonas rizobacterianas consideró las pruebas sobre dos especies: *Axonopus affinis* (Moench) y *Lens esculenta* (Chase), tomando como referencia el bioensayo de la medición del crecimiento radical de Barazani y Friedman (1999), en donde se observó el efecto de la difusión de metabolitos bacterianos volátiles sobre el crecimiento vegetal; para ello, los bioensayos se realizaron en tres fases.

La primera fase consistió en la germinación de las semillas de ambas especies, para someter al efecto de los compuestos volátiles en semillas germinadas de 48 horas; se desinfectaron previamente 20 semillas de ambas especies, con 25 mL de hipoclorito de sodio al 10% por tres minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, posteriormente éstas se sembraron en cajas de Petri que contenían medio sólido de solución mineral (0.20M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.50M NH_4NO_3 , 1.15M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.26M CaCl_2 , 0.20M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.20M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.40M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.20M KH_2PO_4 , 1.20M KNO_3 , 0.50M K_2SO_4 , 0.040M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $1.2 \times 10^{-2}\text{M}$ H_3BO_3 , $1.2 \times 10^{-4}\text{M}$ $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $2.3 \times 10^{-3}\text{M}$ ZnCl_2 , $4.4 \times 10^{-4}\text{M}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $6 \times 10^{-6}\text{M}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EDTA and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: pH 6 adicionado con fitagel 3.5g/L como agente gelante), se dejaron en incubación a 28°C por 48 horas.

La segunda fase de los bioensayos se apoyó en la preparación del inóculo bacteriano.

Para estos bioensayos las pseudomonas productoras de ácido cianhídrico se sembraron por estría masiva, en placas con medio King B suplementado con glicina, se incubaron éstas a 28°C por 24 horas.

Finalmente, **la tercera fase** del bioensayo se basó en exponer las semillas germinadas a las pseudomonas productoras del ácido cianhídrico. Para lo cual, se retiraron las tapas de ambos sistemas, tanto de las semillas germinadas en la solución nutritiva como de los inóculos crecidos en el medio King B + glicina; se unieron las bases, colocando en la parte inferior las semillas y como tapa la base con el inóculo bacteriano. Se sellaron ambas con Parafilm "M" y se dejaron incubando los sistemas por dos días más a 28°C. Los bioensayos se realizaron por triplicado, con 60 semillas por bioensayo considerando como testigo las semillas de ambas especies germinadas en la solución nutritiva sin exposición a los inóculos bacterianos.

Después de transcurrido el tiempo de incubación del bioensayo completo (tercera fase), se consideró la evaluación del crecimiento radical a las 72 y 96 horas después de la siembra de las semillas y su germinación. En estos tiempos, se retiraron las placas con los inóculos bacterianos, y se recuperaron las semillas germinadas para realizar las mediciones de las radículas de ambas especies vegetales.

La evaluación de la fitotoxicidad de los aislados, se determinó con la obtención de los índices del porcentaje de germinación residual normalizado (IGN) y de elongación radical residual normalizado (IER), de acuerdo con Bagur González *et al.* (2011); estos índices se consideran herramientas para evaluar el efecto tóxico de compuestos

presentes o liberados que ejercen una acción inhibitoria sobre el desarrollo; donde ambos establecen valores de toxicidad desde -1 a >0 bajo las siguientes categorías: índice de 0 a -0.25 baja toxicidad, de -0.25 a -0.5 toxicidad moderada, de -0.5 a -0.75 muy tóxico y de -0.75 a -1.0, toxicidad muy alta; índices >0 indican hormesis (Bagur González *et al.*, 2011).

Los cálculos de éstos son los siguientes:

$$IGN = \frac{Germ_{in} - Germ_{testigo}}{Germ_{testigo}}$$

Donde $Germ_{in}$ es el porcentaje promedio de semillas germinadas en presencia del inoculo bacteriano, y $Germ_{testigo}$ es el porcentaje de semillas germinadas en el Testigo.

$$IER = \frac{Elong_{in} - Elong_{testigo}}{Elong_{testigo}}$$

Donde $Elong_{in}$ es la longitud promedio de la radícula de las semillas germinadas en presencia del inóculo bacteriano, y $Elong_{testigo}$ es la longitud promedio de la radícula de las semillas germinadas en el testigo.

Análisis estadístico de los resultados

A todos los resultados obtenidos, se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey-Kramer de comparación múltiple ($p < 0.001$), empleando el paquete estadístico GraphPad InStat version 3.0.

RESULTADOS

Producción de ácido cianhídrico por las pseudomonas rizobacterianas

Las rizobacterias aisladas y sembradas en Medio King B suplementado con glicina para la prueba de producción de HCN presentaron como resultado cambios en la coloración del papel Whatman saturado con picrato; que de acuerdo a la intensidad del color, se dio un valor cualitativo para caracterizar la producción de HCN de los aislados de pseudomonas con el establecimiento de cinco categorías de producción anotadas en la figura 1.

Evaluación del efecto de la producción de ácido cianhídrico sobre la elongación radical de *Axonopus affinis* (Chase) y *Lens esculenta* (Moench)

La figura 2 muestra los resultados de la evaluación de la elongación radical de ambas especies expuestas a los aislados de pseudomonas productoras de HCN. Para el caso de las plántulas de *A. affinis* (Chase) (figs. 2a y 3) los resultados obtenidos de la elongación radical de esta especie, mostraron en general, una disminución en promedio del 75% del crecimiento total comparadas con las plántulas testigo en ausencia de las rizobacterias, mostrando un mayor efecto inhibitorio que el observado sobre las plántulas de *L. esculenta* (Moench) (figs. 2b y 4); para esta especie cinco de las rizobacterias probadas produjeron una disminución del crecimiento en promedio del 50%, comparadas con las plántulas testigo sin presencia de las rizobacterias productoras de HCN; sólo una de ellas mostró efectos positivos

que promovieron la elongación radical de las plántulas que tuvieron la exposición a esta rizobacteria (*Pseudomonas* sp. A52), pero con un efecto contrario al dado por esta rizobacteria sobre el crecimiento radical de *A. affinis* (Chase), donde se obtuvo la mayor inhibición.

DISCUSIÓN

Las rizobacterias pueden actuar contra las plantas al producir sustancias fitotóxicas como el cianuro (Ålström y Burns, 1989), el ácido indol-3-acético (Loper y Schroth, 1986) y la haterumalida A (Gerhardson *et al.*, 2001). La producción de HCN se considera como un atributo particular de las DRB ya que se ha observado que grandes cantidades de HCN deprimen la respiración radical y de manera indirecta la absorción de nutrientes (Schippers *et al.*, 1987), la concentración producida de HCN por las DRB determina la habilidad de los aislados específicos para ser considerados como deletéreos (Kremer y Souissi, 2001).

Un método simple para la identificación de rizobacterias potenciales para el control de malezas consiste en someter sus metabolitos a un ensayo con semillas, el cual se ha descrito como un excelente detector de fitotoxinas (Kremer *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2007).

En este estudio, la caracterización de la producción de HCN mostró que todos los aislados de *Pseudomonas* presentan la síntesis de HCN como posible atributo importante para el biocontrol de malezas, considerándolas como cepas cianogénicas, que de acuerdo a las categorías determinadas por Sharma *et al.* (2011), el orden de la producción cualitativa registrada fue el

siguiente: *Pseudomonas* sp. A101 > *Pseudomonas* sp. A52 > *Pseudomonas* sp. A11 = *Pseudomonas* sp. A21 > *Pseudomonas* sp. A22 > *Pseudomonas* sp. A12.

Los biosayos establecidos para determinar el efecto *in vitro* de estos aislados, con evidencia positiva en la producción de HCN como posible agente inhibidor del crecimiento de plantas; en términos generales evidenciaron su acción tóxica generada sobre las dos especies bajo estudio, donde ésta fue mayor sobre el pasto alfombra (*Axonopus affinis* (Chase)) que sobre lenteja (*L. esculenta* (Moench)).

Si bien la germinación se considera como un evento fisiológico importante en la medición de la toxicidad de compuestos; la elongación radical lo es más; ya que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (Sobrero y Ronco, 2008). De acuerdo con los índices medidos para evaluar el efecto fitotóxico de los aislados rizobacterianos sobre las dos especies probadas (tabla 1), sólo los aislados *Pseudomonas* sp. A52 y *Pseudomonas* sp. A101 ejercieron un efecto moderadamente tóxico sobre la germinación de *A. affinis*; donde se observó el efecto de toxicidad muy alta fue en el desarrollo radical de las plántulas de esta especie, pues todos los aislados resultaron inhibidores de su crecimiento radical, con una respuesta particular de los aislados: *Pseudomonas* sp. A12 y *Pseudomonas* sp. A22, con un incremento en el efecto tóxico sobre las plántulas de *A. affinis* de 96 horas;

caso especial también por el valor más alto de IER obtenido que correspondió al efecto del aislado *Pseudomonas* sp. A52 sobre las plántulas de 72 y 96 horas con un incremento de éste a mayor tiempo de exposición.

Para *L. esculenta* no se presentó efecto tóxico por los aislados de pseudomonas sobre la germinación de sus semillas; solamente el aislado *Pseudomonas* sp. A101 con efecto de baja toxicidad. El resto de los aislados si bien no mostraron efecto tóxico, algunos de ellos como *Pseudomonas* sp. A11, *Pseudomonas* sp. A21, *Pseudomonas* sp. A22 y *Pseudomonas* sp. A52 mostraron un ligero efecto hormético (promoción del crecimiento) sobre la germinación.

En cuanto a la inhibición de la elongación radical, los valores obtenidos del IER mostraron que se presentó toxicidad sobre las plántulas de *L. esculenta*, pero en menor intensidad comparada con el efecto sobre *A. affinis*; según la categoría propuesta por Bagur González et al. (2011) cuatro aislados: *Pseudomonas* sp. A12, *Pseudomonas* sp. A21, *Pseudomonas* sp. A22 y *Pseudomonas* sp. A101, pasaron de categoría “B” (toxicidad moderada) a categoría “C” (muy tóxicas) en las plantas de 72 y 96 horas, caso particular el efecto altamente promotor (“E”) de la cepa *Pseudomonas* sp. A52, mostrado también en la germinación de esta especie.

El presente estudio, al igual que otros estudios realizados como los de Kremer y Souissi (2001), entre otros, plantean el análisis de aislados de rizobacterias que poseen la habilidad para sintetizar HCN para entender los mecanismos responsables de la fitotoxicidad de DRB sobre las plántulas de malezas, a través de la evaluación del efecto

de estas bacterias sobre el crecimiento radical en especies que se consideren plantas indicadoras de los efectos de las concentraciones de HCN producidas. Kremer y Souissi (2001) analizaron la respuesta en semillas de lechuga y dos especies de malezas monocotiledóneas: *Echinochloa* spp. (*Barnyard grass*) y *Setaria viridis* (*green foxtail*) así como una especie de maleza dicotiledónea: *Convolvulus arvensis* (). Dentro de los estudios realizados del efecto de rizobacterias deletéreas sobre el crecimiento radical, los reportados por Ålström (1991) tienen relación con los obtenidos en los bioensayos realizados en este estudio; el autor reporta resultados de laboratorio y experimentos bajo condiciones de invernadero con plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) inoculadas con dos aislados rizosféricos cianogénicos de *Pseudomonas fluorescens*: la cepa S241 bacteria deletérea para *Lactuca sativa* L. y *Phaseolus vulgaris* L. (Ålström y Burns, 1989) y la cepa Å 112 bacteria deletérea para *Triticum aestivum* L. y *Pisum sativum* L. (Ålström y Gerhardson, 1988). Se observó la inhibición en el crecimiento de las raíces de *Lactuca sativa* L. por ambos aislados, donde los metabolitos gaseosos de estos aislados bacterianos productores de cianuro e inhibidores del crecimiento indujeron, de manera significativa las respuestas del crecimiento radical en los cultivares estudiados. Su análisis de la respuesta obtenida de estas rizobacterias fue similar al caso de *A. affinis* (Chase) y *L. esculenta* (Moench), lo que sugiere que la respuesta de éstas especies a los volátiles de los aislados bacterianos está determinada al menos en parte, por su sensibilidad al cianuro. Se han obtenido también respuestas de inhibición para los cultivares *Triticum aestivum* L. pero en contraste con los cultivares *Lactuca sativa* L. no se obtuvo una diferencia con respecto a su sensibilidad

al cianuro, lo que indicó que la diferencia obtenida en la respuesta de los cultivares de *Triticum aestivum* L. a los volátiles del aislado Á 112, deben de explicarse por la acción de otros metabolitos bacterianos volátiles diferentes al cianuro. Los resultados obtenidos de producción de HCN también estuvieron relacionados con el medio de cultivo empleado; no solamente por el uso del medio King B característico para pseudomonas; sino también de acuerdo con el hecho de que este medio contenía aditivos del crecimiento que promueven la cianogénesis, tales como los aminoácidos glicina y metionina. La sensibilidad diferencial de los cultivares de *Lactuca sativa* L. al ácido cianhídrico puede deberse a la diferencia en la habilidad de estos cultivares para utilizar la vía de respiración cianuro resistente, podría tener relación con lo obtenido en este trabajo con *L. esculenta* (Moench), donde, bajo la exposición al cianuro, las plantas generalmente toman una vía alterna que es la vía no sensible al cianuro (Siedow y Berthold, 1986), también vista en *Triticum aestivum* L. (McCaig y Hill, 1977) y de *Pisum sativum* L. (Obenland *et al.* 1988). La respuesta obtenida del efecto inhibitorio del crecimiento radical por los aislados de pseudomonas probados sugiere la relación entre su efecto fitotóxico y su producción de HCN, como lo reportado por Rudrappa *et al.* (2008), quienes evaluaron el efecto de diferentes cepas de *Pseudomonas* (tanto *Pseudomonas fluorescens* como *Pseudomonas aeruginosa*) sobre el crecimiento de raíces de *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh) Col-0. Barazani y Friedman (1999), analizaron a través de sus trabajos, la hipótesis de la inhibición o promoción de la elongación radical, causada por la acción de DRB's o de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria:

PGPR), respectivamente, de acuerdo con la excreción de diferentes concentraciones de ácido indol acético (AIA) en plántulas de *Lactuca sativa* L. cv. Noga 936; donde el efecto de la inoculación con *Streptoverticillium* sp., redujo el crecimiento radical de *Lactuca sativa* L. cv. Noga 936 de un 34.6 a 62.2% después de 48 horas y las PGPR's probadas promovieron su crecimiento radical con un 49.6% en promedio de su actividad. Esta referencia podría asociarse con el efecto obtenido en este trabajo por la rizobacteria *Pseudomonas* sp. A52, donde el efecto inhibitorio en el crecimiento radical en las plántulas de *A. affinis* y el de promoción en el crecimiento radical en las plántulas de *L. esculenta*, aparentemente resulta contradictorio, aun siendo una rizobacteria altamente productora de este compuesto volátil; y quizá está relacionado con lo reportado por estos autores y por Kremer *et al.* (1988) y Kremer y Souissi (2001), sobre los mecanismos responsables de la fitotoxicidad de las DRB en plántulas de malezas, donde no solamente un metabolito puede por sí mismo explicar los efectos deletéreos sobre el crecimiento vegetal; ya que algunas pseudomonas que inhiben el crecimiento vegetal, producen AIA y HCN, ambos o ninguno de ellos. En este trabajo, se sugiere que el efecto en la inhibición del crecimiento por estas DRB's cianogénicas o parcialmente cianogénicas aparentemente respondió a mecanismos diferentes a la producción de este compuesto volátil; quizá por la producción de fitohormonas, al generar una promoción en la elongación radical en *L. esculenta* (Moench) e inhibición en *A. affinis* (Chase), al grado de inducir el crecimiento radical entre un 7 a 9% más que las plántulas testigo; pero inhibitorio para la segunda especie, en la cual como dato importante se observaron las raíces más delgadas y con

una coloración café a diferencia de las raíces de las plántulas testigo.

Finalmente, no obstante que el control microbiano de malezas representa una técnica inovativa para el manejo de las malezas a través del empleo de herbicidas biológicos; aún quedan por resolver algunos puntos antes de que éstos puedan emplearse ampliamente en la agricultura. Estos retos incluyen el mejoramiento en la eficacia de la actividad microbiológica, la sobrevivencia de los microorganismos, la persistencia de los compuestos supresivos, los sistemas de liberación, la determinación de un amplio espectro de hospederos y el evitar los daños sobre organismos considerados como no blanco de acción (Stubbs y Kennedy, 2012). Cabe mencionar que más que considerar el empleo de las rizobacterias como una estrategia de control se considera como un mecanismo regulador del desarrollo de las malezas antes o en coincidencia con la emergencia de las plantas de cultivo. Por ello, las DRB no necesariamente erradican los problemas de malezas, pero significativamente suprimen el crecimiento temprano de éstas y permiten el desarrollo de las plantas cultivadas a través de una competencia efectiva con el debilitamiento de las plántulas de malezas (Flores-Vargas y O'Hara, 2006).

CONCLUSIONES

Considerando lo anterior y de acuerdo con los resultados obtenidos con relación a la evidencia de que los aislados de pseudomonas son rizobacterias cianogénicas y de su efecto fitotóxico medido sobre las especies vegetales probadas; se sugieren a éstas como posibles agentes de biocontrol con pastos que sean considerados malezas; ya que en general se observó que inhiben

su crecimiento radical; sin embargo, un enfoque particular lo tiene la rizobacteria *Pseudomonas* sp. A52, la cual presentó no solamente actividad como una DRB sino también como una PGPR; lo que la hace más importante de analizar en cuanto a su potencial y espectro de acción; tanto para malezas monocotiledóneas como para dicotiledóneas, la cual es recomendable como un posible agente de biocontrol con actividad múltiple.

AGRADECIMIENTOS

El segundo autor agradece a la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN, el apoyo financiero otorgado al Proyecto SIP: 20131494, para la realización de este trabajo. Los autores agradecen a la Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas (COFAA-IPN), al EDI (Estímulo al Desempeño de Investigadores-IPN) y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI-CONACyT).

LITERATURA CITADA

- Ahonsi, M.O.; D.K. Berner, A.M. Emechebe, y S.T. Lagoke, 2002. "Selection of rhizobacterial strains for suppression of germination of *Striga hermonthica* (Del.)". *Benth. seeds. Biol. Control*, **24**: 142-152.
- Ålström, B., y B. Gerhardson, 1988. "Differential reactions of wheat and pea genotypes to root inoculation with growthaffecting rhizosphere bacteria". *Plant Soil*, **109**: 263-269.
- _____, 1989. "Wheat cultivar reactions to deleterious rhizosphere bacteria under gnotobiotic conditions". *Plant Soil*, **117**: 157-165.

- Ålström, S., y R.G. Burns, 1989. "Cyanide production by rhizobacteria as possible mechanism of plant growth inhibition". *Biol. Fert. Soils*, **7**: 232.
- Ålström, B., 1991. "Role of bacterial cyanide production in differential reaction of plant cultivars to deleterious rhizosphere pseudomonads". *Plant Soil*, **133**: 93-100.
- Bagur González, M.G.; C. Estepa Molina, F. Martín Peinado, y S. Morales Ruano, 2011. "Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site". *J. Soils Sediments*, **11**: 281-289.
- Barazani, O.; y J. Friedman, 1999. "Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria?" *J. Chem. Ecol.*, **25**: 2397-2406.
- Blumer, C., y D. Haas, 2000. "Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis". *Arch. Microbiol.*, **173**: 170-177.
- Carvalho, D.D.C.; D.F. Oliveira, R.S.B. Corrêa, V.P. Campos, R.M. Guimarães, y J.L. Coimbra, 2007. "Rhizobacteria able to produce phytotoxic metabolites". *Braz. J. Microb.*, **38**: 759-765.
- Daigle, D.G.; W.J. Connick Jr., y S.M. Boyetchko, 2002. "Formulating a weed-suppressive bacterium in 'Pesta'". *Weed Technol.*, **16**: 407-413.
- Devi, K.K.; N. Seth, Sh. Kothamasi, y D. Kothamasi, 2007. "Hydrogen cyanide-producing rhizobacteria kill subterranean termite *Odontotermes obesus* (Rambur) by cyanide poisoning under in vitro conditions". *Current Microbiology*, **54**: 74-78.
- Flores-Vargas, R.D., y G.W. O'Hara, 2006. "Isolation and characterization of rhizosphere bacteria with potential for biological control of weeds in vineyards". *J. Appl. Microbiol.*, **100**: 946-954.
- Gerhardson, B.; S. Ålström, y R.B. Imert, 1985. "Plant reactions to inoculation of roots with fungi and bacteria". *Phytopathol. Z.*, **114**: 108-117.
- Gerhardson, B.; C. Thaning, R. Weissmann, J. Borowicz, C. Welch, y R. Hedman, 2001. *New bacterial isolate and its active metabolites, including new compound Haterumalide X, useful for controlling weeds and treating fungal diseases in plants, human and animals*. S.E. Pat. 9904334-A, julio 26, 2001.
- Gurley, H.G., y R.E. Zdor, 2005. "Differential rhizosphere establishment and cyanide production by alginate-formulated weed-deleterious rhizobacteria". *Curr. Biol.*, **50**: 167-171.
- Hoagland, R.E., 2001. "Microbial allelochemicals and pathogens as bioherbicidal agents". *Weed Technol.*, **15**: 835-857.
- Kremer, R.J., y A.C. Kennedy, 1996. "Rhizobacteria as biocontrol agents of weeds". *Weed Technol.*, **10**: 601-609.
- Kremer, R.; T. Souissi, y L. Stanley, 1998. *Characterization of rhizosphere mi-*

- croorganisms for potential as biocontrol agents of weeds*. Proceedings of the World Congress of Soil Science, 1145.
- Kremer, R.J., y T. Souissi, 2001. "Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth". *Curr. Microbiol.*, **43**: 182-186.
- Kremer, R.J.; A.J. Caesar, y T. Souissi, 2006. "Soilborne microorganisms of *Euphorbia* are potential biological control agents of the invasive weed leafy spurge". *App. Soil Ecol.*, **32**: 27-37.
- Li, J., y R.J. Kremer, 2000. "Rhizobacteria associated with weed seedlings in different cropping systems". *Weed Sci.*, **48**:734-741.
- Loper, J.E., y M.N. Schroth, 1986. "Influence of bacteria sources of Indole-3-acetic acid on root elongation of sugarbeet". *Phytopathol.*, **76**: 386-389.
- Mazzola, M.; P.W. Stahlman, y J.E. Leach, 1995. "Application method affects the distribution and efficacy of rhizobacteria suppressive of downy brome (*Bromus tectorum*)". *Soil Biol. Biochem.*, **27**: 1271-1278.
- McCaig, T.N., y R.D. Hill, 1977. "Cyanide-insensitive respiration in wheat: Cultivar differences and effects of temperature, carbon dioxide, and oxygen". *Can. J. Bot.*, **55**: 549-555.
- Mortensen, K., 1998. "Biological control of weeds using microorganisms". Boland G, y L. Kuykendall (eds). *Plant-microbe interactions and biological control*. New York: Marcel Dekker, pp. 223-248.
- Obenland, D.; C. Hiser, L. McIntosh, R. Shibles, y C.R. Stewart, 1988. "Occurrence of alternative respiratory capacity in soybean and pea". *Plant Physiol.*, **88**: 528-531.
- Owen, A., y R. Zdor, 2001. "Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental glycine". *Soil Biol. Biochem.*, **33**: 801-809.
- Rudrappa, T.; R.E. Splaine, M.L. Biedrzycki, y H.P. Bais, 2008. "Cyanogenic pseudomonads influence multitrophic interactions in the rhizosphere". *PLoS ONE*, **3**: 2073.
- Schippers, B.; A.W. Bakker, y P.A. Bakker, 1987. "Interaction of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices". *Annu. Rev. Phytopathol.*, **25**: 339-358.
- Schippers, B.; A.W. Bakker, P.A.H.M. Bakker, y R. Van Peer, 1990. "Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions". *Plant Soil.*, **129**: 211-220.
- Sharma, M.; V. Mishra, N. Rau, y R.Sh. Sharma, 2011. "Functionally diverse rhizobacteria of *Saccharum munja* (a native wild grass) colonizing abandoned morrum mine in Aravalli hills (Delhi)". *Plant Soil*, **341**: 447-459.

- Siddiqui, I.A.; S.Sh. Shaukat, I.H.Sheikh, y A. Khan, 2006. "Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato". *World J. Microb. Biot.*, **22**: 641-650.
- Siedow, J.N., y D.A. Berthold, 1986. The alternative oxidase: a cyanide-resistant respiratory pathway in higher plants. *Physiol. Plant.*, **66**: 569-573.
- Sobrero, M.C., y A. Ronco A., 2008. "Ensayo de toxicidad aguda aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L". *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. (Ramírez Romero P. y Mendoza Cantú A., Compiladoras). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). pp. 55-68.
- Stubbs, T.L., y A.C. Kennedy, 2012. "Microbial weed control and microbial herbicides". *Herbicides: Environmental Impact Studies and Management Approaches*, Dr. Rubén Álvarez-Fernández (Ed.), pp. 135-166.
- Sturz, A.V.; B.G. Matheson, W. Arsenault, J. Kimpinski, y B.R. Christie, 2001. "Weeds as a source of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural soils". *Can. J. Microbiol.*, **47**: 1013-1024.
- Suslow, T.V., y M.N. Schroth, 1982. "Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth". *Phytopathol.*, **72**: 111-115.
- van Veen, J; L. van Overbeek, y J. van Elsas, 1997. "Fate and activity of microorganisms introduced into soil". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**: 121-135.
- Vining, L.C., 1990. "Functions of secondary metabolites". *Annu. Rev. Microbiol.*, **44**: 395-427.

Recibido: 2 agosto 2013. Aceptado: 1 septiembre 2014.

Tabla 1. Determinación del IER* e IGN* de *Axonopus affinis* y *Lens esculenta*

| Rizobacterias | <i>Axonopus affinis</i> , IER | | <i>Lens esculenta</i> , IER | |
|-----------------------------|-------------------------------|----------|-----------------------------|----------|
| | 72 horas | 96 horas | 72 horas | 96 horas |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A11 | D, -0.88 | D, -0.87 | B, -0.52 | B, -0.4 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A12 | D, -0.82 | D, -0.85 | B, -0.46 | B, -0.51 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A21 | D, -0.88 | D, -0.89 | B, -0.5 | C, -0.58 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A22 | D, -0.85 | D, -0.88 | B, -0.51 | C, -0.56 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A52 | D, -0.91 | D, -0.95 | E, 0.058 | E, 0.09 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A101 | D, -0.88 | D, -0.87 | B, -0.46 | C, -0.57 |

| Rizobacterias | <i>Axonopus affinis</i> , IGN | | <i>Lens esculenta</i> , IGN | |
|-----------------------------|-------------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
| | 72 horas | 96 horas | 72 horas | 96 horas |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A11 | A, -0.11 | A, -0.018 | E, 0.016 | E, 0.016 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A12 | A, -0.19 | A, -0.11 | 0 | 0 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A21 | A, -0.05 | A, -0.056 | E, 0.016 | E, 0.016 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A22 | A, -0.04 | A, -0.056 | E, 0.016 | 0 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A52 | A, -0.21 | B, -0.43 | 0 | E, 0.016 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. A101 | B, -0.35 | A, -0.075 | A, -0.016 | A, -0.016 |

*Donde: A= 0 a -0.25 baja toxicidad, B= -0.25 a -0.5 toxicidad moderada, C= -0.5 a -0.75 muy tóxico, D = -0.75 a -1.0 toxicidad muy alta y E = > 0 hormesis (Bagur González *et al.*, 2011).

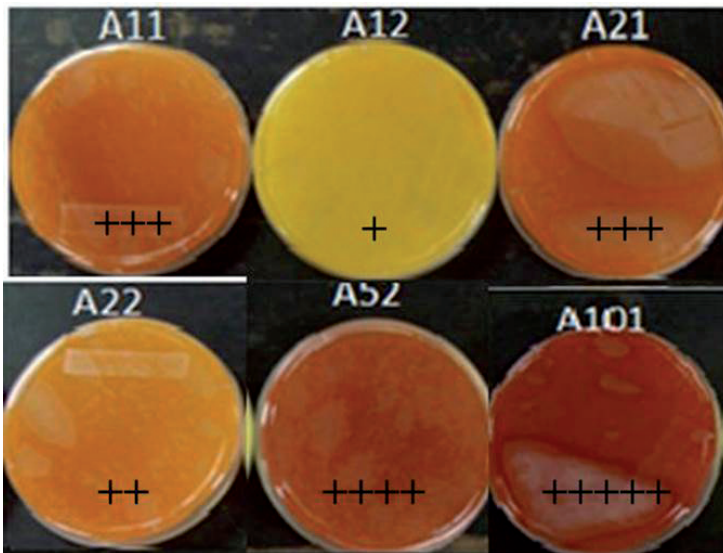


Fig. 1. Comparación de la producción de HCN de las rizobacterias empleadas, de acuerdo con la prueba de placa hermética (Kremer y Souissi, 2001).

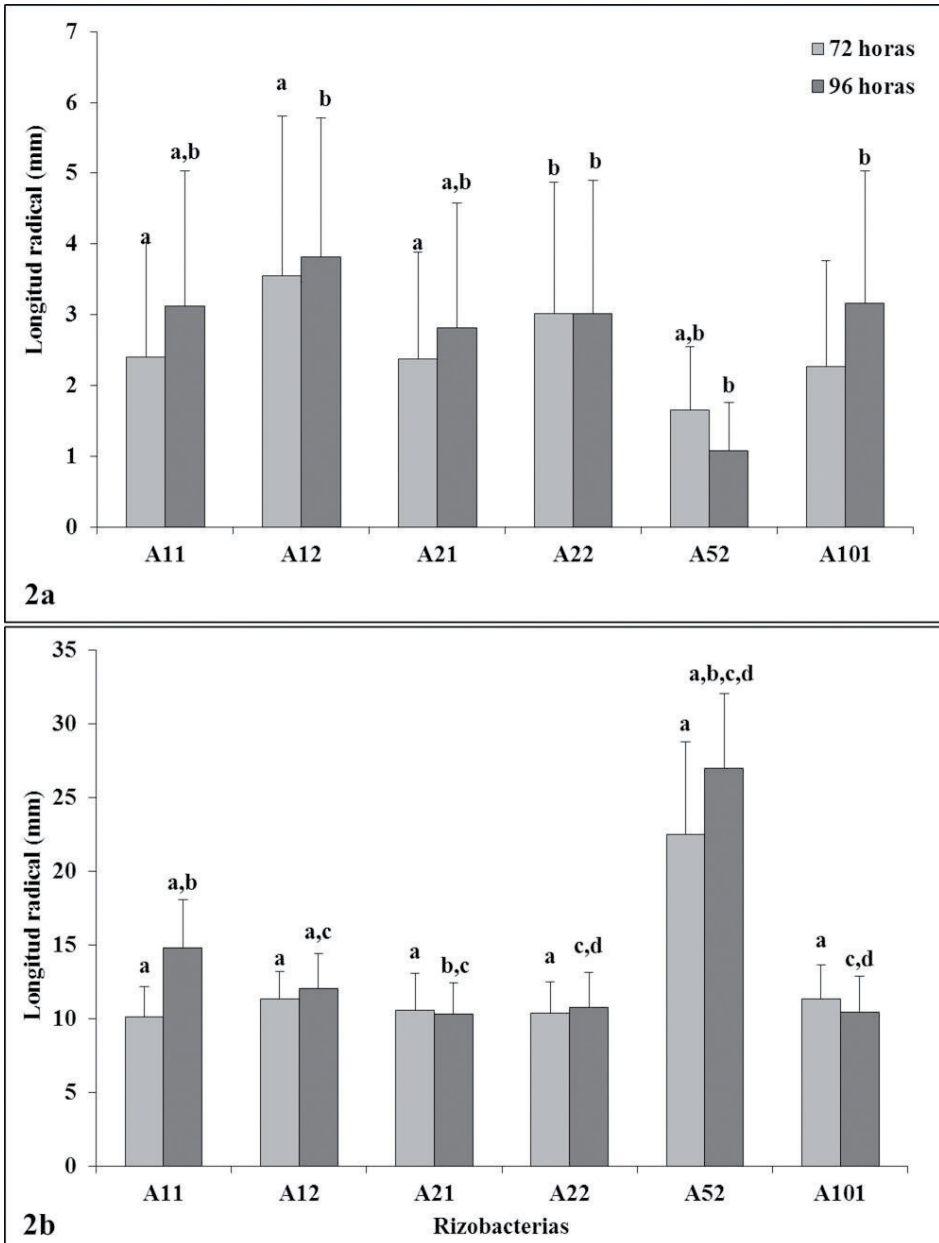


Fig. 2. Medición de la longitud radical de las plántulas de: a) *Axonopus affinis* (Chase) y b) *Lens esculenta* (Moench), a 72 y 96 horas de exposición a los aislados de pseudomonadas. Las diferentes letras muestran las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

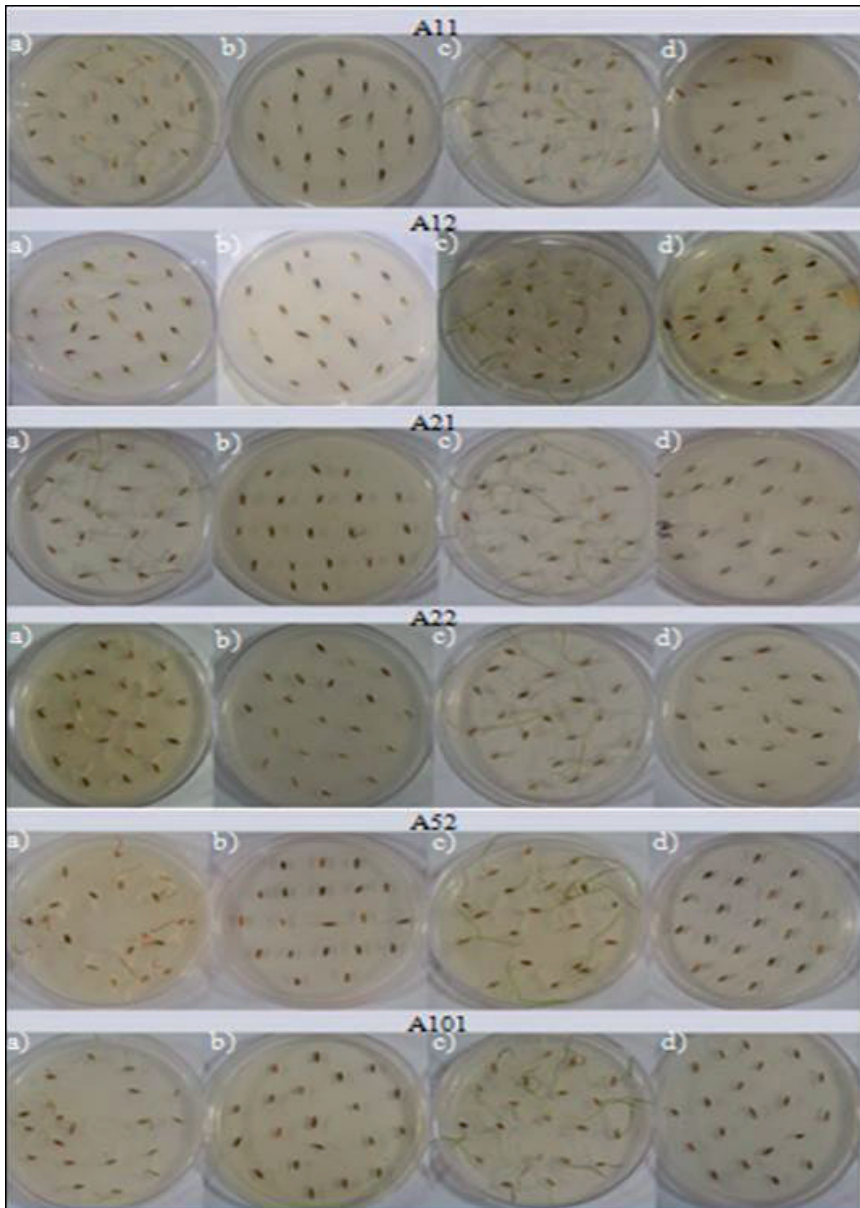


Fig. 3. Evaluación de la longitud radical de plantas de *Axonopus affinis* (Chase) expuestas a las rizobacterias seleccionadas: **a)** placa sin exposición a volátiles (testigo) a las 72 horas; **b)** placa con exposición a volátiles después de 72 horas; **c)** placa sin exposición a volátiles (testigo) a las 96 horas, y **d)** placa con exposición a volátiles después de 96 horas.

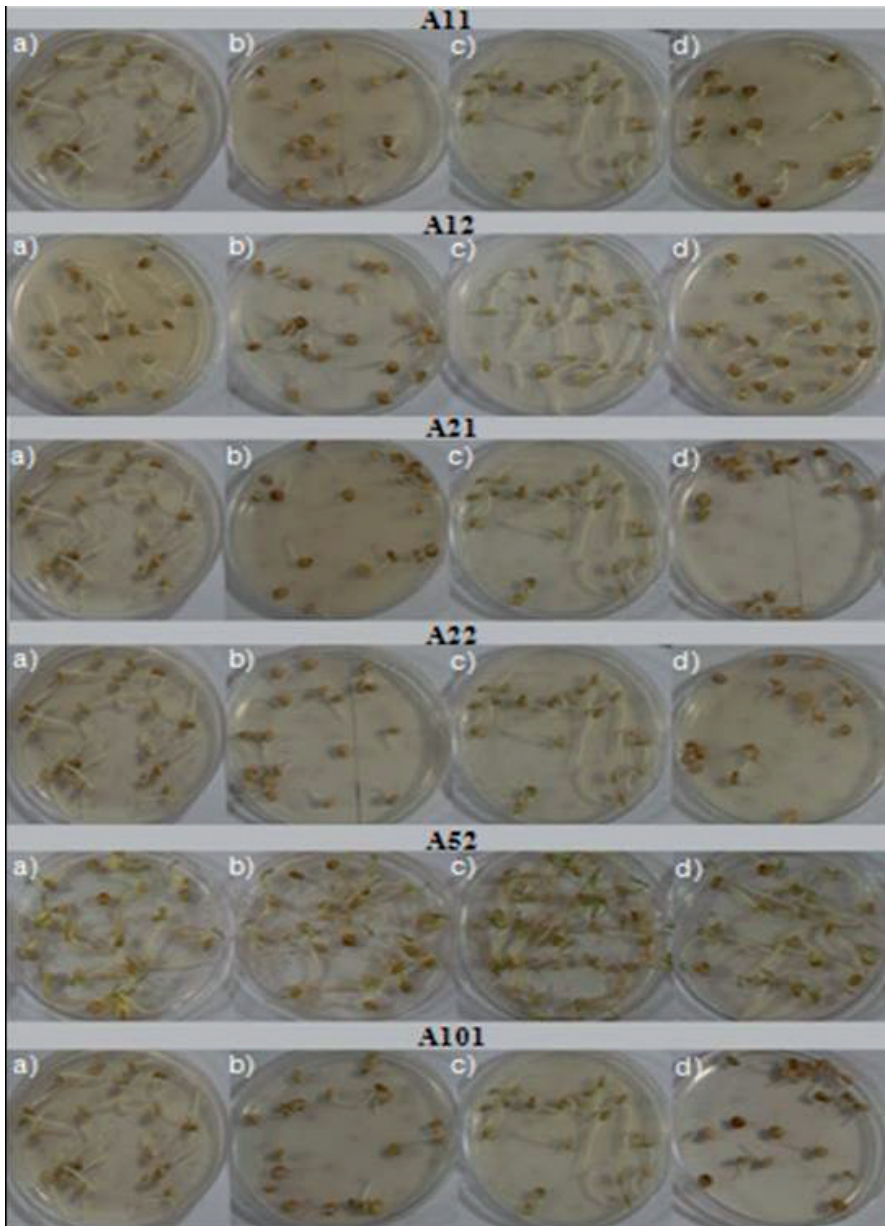


Fig. 4. Evaluación de la longitud radical de las plántulas de *Lens esculenta* (Moench) expuestas a las rizobacterias seleccionadas: **a)** placa sin exposición a volátiles (testigo) a las 72 horas; **b)** placa con exposición a volátiles después de 72 horas; **c)** placa sin exposición a volátiles (testigo) a las 96 horas, y **d)** placa con exposición a volátiles después de 96 horas.