

**Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes con potencial de biocontrol de enfermedades de tallo y de vaina en arroz. Aplicación del control biológico al manejo de enfermedades en arroz.**

*Tesis presentada para optar al título de Magíster de la Universidad de Buenos Aires,  
Área de Producción Vegetal, orientación en Protección Vegetal*

Miriam Noemí Asselborn  
Ingeniera Agrónoma –Universidad Nacional del Litoral- 2005

Lugar de trabajo: INTA – Estación Experimental Concepción del Uruguay  
Cátedra de Microbiología Agrícola (INBA-FAUBA-CONICET)



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

## **COMITÉ CONSEJERO**

### **DIRECTOR DE TESIS**

Olga Susana Correa

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

*Magister Scientiae* en Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires)

### **1° CONSEJERO DE ESTUDIOS:**

María Virginia Pedraza

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Mar del Plata)

*Magíster Scientiae* en Producción Vegetal (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Doctora en Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Mar del Plata)

### **2° CONSEJERO DE ESTUDIOS:**

Marcela Susana Montecchia

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

## **JURADO DE TESIS**

Dra. Marcela Edith Gally (Universidad de Buenos Aires)

Dr. Carlos Alberto Mazza (Universidad de Buenos Aires)

Dr. Oscar Adolfo Ruiz (Universidad Nacional del Nordeste)

Fecha de defensa:

**7 de diciembre de 2017**

*Este trabajo de tesis está dedicado:*

*Con todo mi amor y gratitud, a mi querido viejo*

*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros autores), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*

***Miriam Noemí Asselborn***

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, a INTA, por haberme dado la oportunidad de perfeccionarme y realizar mi formación de posgrado.

A mi directora de tesis, Olga Correa, por transmitirme sus conocimientos, por su tiempo, esfuerzo y dedicación. Por su predisposición para ayudarme, por su calidez humana y por apuntalarme en las situaciones difíciles.

A Virginia por estar siempre a mi lado y enseñarme todo lo que aprendí desde que ingresé a INTA. A Marcela y Marcelo, por ayudarme y mostrarse siempre dispuestos a colaborar desde su lugar.

A Gladys, por colaborar conmigo durante una gran etapa previo a la tesis.

A mis compañeros de INTA, Lucrecia, Javier, Leo, por brindarme toda su ayuda.

A Antonella, por prestarse de manera incondicional con las actividades desinteresadamente.

A la Cátedra de Microbiología Agrícola de la UBA, por prestarme sus instalaciones y darme un espacio sin hacerme sentir un extraño.

A la Dra. Fanny Altamirano, de la Universidad de Jujuy, y al BNM (Banco Nacional de Microorganismos) que muy amablemente me prestaron sus cepas para las investigaciones realizadas.

A la Escuela de Postgrado de la Facultad de Agronomía de la UBA, prestigiosa institución, que me permitió realizar mi formación de posgrado y a todo su personal que siempre tuvo muy buena predisposición en todos los aspectos académicos y administrativos.

A mis amigos, Constanza y Facundo por recibirme en su casa durante los últimos días previos a la entrega final y brindarme toda su calidez y contención.

A Francisco, mi compañero de la vida, por darme su apoyo incondicional, por su tiempo y estar siempre a mi lado.

A mis viejos, por enseñarme a ser buena persona y dejarme la herencia más valiosa, la educación.

Por último y muy especialmente, a mi hijo Joaquín, por ser el motor de todos mis actos y esfuerzos.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv

### **CAPÍTULO N° 1**

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
1.1. Origen e historia del arroz.....	2
1.2. Tecnología de la producción de arroz.....	2
1.4. Importancia económica de la actividad arrocería en Argentina.....	4
1.5. Sistemas de producción del cultivo de arroz en el mundo.....	5
1.6. Causa e importancia de las pérdidas por enfermedades en el cultivo de arroz.....	6
1.8. Manejo de ETV.....	11
1.9. Antecedentes de uso de agentes microbianos en Argentina.....	14
1.10. Fundamento de la elección del tema de tesis.....	14
1.11. Objetivos e hipótesis.....	15

### **CAPÍTULO N° 2.**

<b>DETERMINACIÓN DE MECANISMOS POTENCIALES DE ACCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS NATIVOS DE <i>Pseudomonas</i> FLUORESCENTES</b> .....	16
<b>2.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
2.1.1. Competencia por nutrientes y espacio.....	17
2.1.2. Producción de metabolitos secundarios antifúngicos.....	18
2.1.3. Producción de sideróforos.....	18
2.1.4. Producción de enzimas hidrolíticas.....	18
<b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
2.2.1. Aislamientos bacterianos.....	20
2.2.2. Aislamientos fúngicos.....	21
<b>2.3. RESULTADOS</b> .....	24
<b>2.4. DISCUSIÓN</b> .....	36

### **CAPÍTULO N° 3**

<b>TAXONOMÍA MOLECULAR Y CLÁSICA DE LOS AISLAMIENTOS NATIVOS DE <i>Pseudomonas</i> FLUORESCENTES</b> .....	39
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	40
3.1.2. Caracterización de los aislamientos nativos.....	42

<b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	43
3.2.2. Caracterización genotípica e identificación .....	43
3.2.3. Caracterización microbiológica clásica.....	44
3.2.4. Caracterización del crecimiento de las cepas nativas en medio de cultivo líquido ...	45
<b>3.3. RESULTADOS</b> .....	46
3.3.1. Caracterización molecular e identificación de las cepas bacterianas .....	46
3.3.2. Caracterización microbiológica clásica.....	48
3.3.3. Caracterización del crecimiento de las cepas nativas en medio de cultivo líquido ...	49
<b>3.4. DISCUSIÓN</b> .....	51
 <b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>EFFECTO DE LAS CEPAS BACTERIANAS SOBRE LA GERMINACIÓN DE LOS ESCLEROCIOS DE <i>R. oryzae</i>, <i>R. solani</i> y <i>S. oryzae</i> Y EFFECTO DE LA APLICACIÓN A LAS SEMILLAS</b> .....	
	53
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	54
<b>4.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	55
4.2.1. Efecto sobre la germinación de los esclerocios.....	55
4.2.2. Efecto de la aplicación de <i>P. fluorescens</i> sobre el desarrollo de hongos en semillas de arroz.....	55
<b>4.3. RESULTADOS</b> .....	57
4.3.1. Efecto sobre la germinación de los esclerocios.....	57
4.3.2. Efecto de la aplicación de <i>P. fluorescens</i> sobre el desarrollo de hongos en semillas de arroz.....	58
<b>4.4. DISCUSIÓN</b> .....	60
 <b>CAPÍTULO N° 5</b>	
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	
	62
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	67

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 2.1.</b> Listado de aislamientos y cepas patrones utilizados en las determinaciones moleculares y fenotípicas.....	20
<b>Cuadro 2.2.</b> Crecimiento en diámetro de colonias (cm) de <i>R. oryzae</i> , registrados luego de 9 días de incubación a 28°C con exposición a metabolitos volátiles.....	27
<b>Cuadro 2.3.</b> Crecimiento en diámetro de colonias (cm) de <i>R. solani</i> , registrados luego de 9 días de incubación a 28°C con exposición a metabolitos volátiles.....	28
<b>Cuadro 2.4.</b> Crecimiento en diámetro de colonias (cm) de <i>S. oryzae</i> , registrados luego de 9 días de incubación a 28°C con exposición a metabolitos volátiles. ....	30
<b>Cuadro 3.1.</b> Parámetros de crecimiento de las cepas nativas de <i>P. fluorescens</i> en medio KB. Crecimiento máximo al comienzo de la etapa estacionaria (Log ufc ml <sup>-1</sup> ), velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ h <sup>-1</sup> ) y tiempo de duplicación (h) en etapa exponencial.....	50
<b>Cuadro 4.1.</b> Porcentaje de la germinación de esclerocios de <i>R. oryzae</i> luego de ser incubados durante 72 h en suspensiones de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	57
<b>Cuadro 4.2.</b> Porcentaje de la germinación de esclerocios de <i>S. oryzae</i> luego de ser incubados durante 72 h en suspensiones de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	58
<b>Cuadro 4.3.</b> Porcentaje de semillas con desarrollo fúngico .....	59
<b>Cuadro 5.1.</b> Resumen de los resultados del trabajo de investigación: Caracterización de los aislamientos nativos.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estados fenológicos del cultivo de arroz .....	3
<b>Figura 1.2.</b> Principales países productores de arroz. ....	3
<b>Figura 1.3.</b> Ubicación geográfica de las zonas productoras de arroz en Argentina.....	4
<b>Figura 1.4.</b> Superficie sembrada y producción de arroz (kg/ha) por provincia .....	5
<b>Figura 1.5.</b> Síntomas de la Pudrición del Tallo por <i>Sclerotium oryzae</i> .....	7
<b>Figura 1.6.</b> Síntomas del Manchado de Vainas por <i>R. oryzae</i> , <i>R. solani</i> y <i>R. oryzae-sativae</i> .....	9
<b>Figura 1.7</b> Esquema de síntomas de las especies de <i>Rhizoctonia</i> ssp. causantes del Manchado de Vainas.....	10
<b>Figura 2.1.</b> Ejemplo del efecto de los compuestos difusibles sobre el crecimiento de <i>R. oryzae</i> .....	24
<b>Figura 2.2.</b> Crecimiento en diámetro de colonias (cm) de <i>R. oryzae</i> , expuestos a compuestos difusibles de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	25
<b>Figura 2.3.</b> Crecimiento en diámetro de colonias (cm) de <i>S. oryzae</i> expuestos a compuestos difusibles de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	26
<b>Figura 2.4.</b> Crecimiento en diámetro de colonias (cm) de <i>R. oryzae</i> , expuestos a compuestos volátiles de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	28
<b>Figura 2.5.</b> Crecimiento en diámetro de colonias (cm) de <i>R. solani</i> , expuestos a compuestos volátiles de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	29
<b>Figura 2.6.</b> Crecimiento en diámetro de colonias (cm) de <i>S. oryzae</i> expuestos a compuestos volátiles de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes.....	31
<b>Figura 2.7.</b> Producción de HCN en placa de Petri.....	32
<b>Figura 2.8.</b> Producción de sideróforos en las cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. en medio CAS 33	33
<b>Figura 2.9.</b> Producción de sideróforos en medio líquido KB.....	34

<b>Figura 2.10.</b> Producción de proteasas en medio LDA.....	34
<b>Figura 3.1.</b> Perfiles obtenidos por rep-PCR con cebadores BOX (A) ERIC (B) y REP (C). 1: Marcador de peso molecular de 1.000 pb. 2: M1A. 3: M1B. 4. M1C. 5: M1E. 6:M1F. 7: M1G.....	46
<b>Figura 3 2.</b> Dendrograma (Pearson/UPGMA) del análisis de los perfiles genéticos (BOX- PCR) de los aislamientos nativos de arroceras de Entre Ríos.....	47
<b>Figura 3.3.</b> Resultados de la caracterización por restricción múltiple del ADN con enzimas <i>AluI</i> , <i>HinfI</i> , <i>RsaI</i> y <i>MseI</i> .....	47
<b>Figura 3. 4.</b> Observación microscópica (1.000 x) de la tinción de Gram de células de las cepas nativas.....	48
<b>Figura 3. 5.</b> Actividad de la enzima citocromo c-oxidasa.....	49
<b>Figura 3. 6.</b> Producción de pigmentos verde amarillentos en medio KB.....	49
<b>Figura 4.1.</b> Presencia de hongos sobre semillas de Don Juan con y sin tratamiento bacteriano.....	58

## ABREVIATURAS

**2,4-DAPG:** 2,4-Diacetilfloroglucinol

**ACB:** agente de control biológico

**APG:** agar papa glucosado

**ARDRA:** del inglés, Amplified rDNA Restriction Analysis

**ASA:** Agar Salvado de Arroz

**BNM:** Banco Nacional de Microorganismos

**CAS:** del inglés, Chrome Azurol S.

**CNG:** caldo nutritivo con glucosa

**ETV:** enfermedades de tallo y vaina del arroz.

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

**HDTMA:** bromuro de hexadecyltrimetilamonio

**HCN:** ácido cianhídrico

**KB:** medio de cultivo King B

**Kg/ha:** Kilogramos de granos por hectárea de superficie.

**LDA:** medio de leche descremada agarizado

**mgL<sup>-1</sup>:** miligramos por litro de agua

**M1:** aislamiento nativo de *Pseudomonas fluorescens*

**MV:** Manchado de Vainas

**PCR:** del inglés, polymerase chain reaction,

**PT:** Pudrición del Tallo

**%GE:** porcentaje de germinación de esclerocios

**rep-PCR:** del inglés, repetitive element sequence-based polymerase chain reaction

***R. oryzae*:** aislamiento de *Rhizoctonia oryzae*

***R. oryzae-sativae***: aislamiento de *Rhizoctonia oryzae-sativae*

***R. solani***: aislamiento de *Rhizoctonia solani*

**rpm**: revoluciones por minuto

***S. oryzae***: aislamiento de *Sclerotium oryzae*

**SSD**: del inglés, stem and sheaths diseases.

**td**: tiempo de duplicación de las bacterias

**$\mu$** : velocidad específica de crecimiento

**ufc ml<sup>-1</sup>**: unidades formadoras de colonias por mililitro

**UPGMA**: del inglés, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic

**Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes con potencial de biocontrol de enfermedades de tallo y de vaina. Aplicación del control biológico al manejo de enfermedades en arroz.**

**RESUMEN**

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el cultivo regional más importante del litoral argentino, especialmente en Corrientes y Entre Ríos. La siembra directa y el monocultivo favorecen el desarrollo de enfermedades de tallo y vaina (ETV), principalmente de la Pudrición del Tallo (*Sclerotium oryzae*) y del complejo de Manchado de Vainas (*Rhizoctonia oryzae*, *R. oryzae-sativae* y *R. solani*). Estos patógenos sobreviven como esclerocios en el suelo. Las herramientas de control existentes son limitadas, porque los genotipos no presentan resistencia genética y los fungicidas disponibles producen un control parcial generando una amenaza ambiental. Un manejo sustentable con herramientas más inocuas es demandado. El objetivo de este trabajo fue caracterizar seis aislamientos nativos de *Pseudomonas* fluorescentes, con potencial de biocontrol sobre *R. oryzae*, *R. solani* y *S. oryzae*. Los aislamientos fueron caracterizados por producción de metabolitos difusibles, volátiles, HCN, sideróforos y proteasas, como potenciales mecanismos de acción. Posteriormente, fueron identificados a nivel de cepa y especie con técnicas moleculares. Además, se evaluó el efecto de su aplicación sobre la germinación de esclerocios de los patógenos y su aplicación en semillas *in vitro*. Todos los aislamientos produjeron más de un mecanismo, aunque el aislamiento denominado M1C se destacó por la efectividad de sus metabolitos para biocontrol. Todos fueron identificados como *Pseudomonas fluorescens* y tres cepas fueron diferenciadas molecularmente. Todas las cepas redujeron entre 80-100% la germinación de esclerocios de *R. oryzae*, M1C redujo 40% la germinación de esclerocios de *S. oryzae* y ninguna afectó la germinación de esclerocios de *R. solani*. Todas disminuyeron el crecimiento de hongos en semillas, sin mejorar el porcentaje de germinación. Por los atributos de la M1C, es propuesta como candidata con potencial biocontrol para investigaciones futuras. Este trabajo brinda información muy valiosa sobre la posibilidad de utilizar a *P. fluorescens* para el control de ETV, en Argentina.

**Palabras claves:** arroz, enfermedades, control biológico, *Sclerotium oryzae*, *Rhizoctonia* spp. *Pseudomonas*, Manchado de Vainas, Pudrición del Tallo, ETV.

## **Phenotypic and Genotypic characterization of fluorescent *Pseudomonas* with biocontrol potential of stem and sheaths rice diseases. Application of biological control to management diseases in rice**

### **ABSTRACT**

Rice is the most important crop in the littoral region, especially in Corrientes and Entre Ríos provinces. No-tillage system and monoculture favors the development of stem and sheath diseases (SSD), mainly Stem Rot (*Sclerotium oryzae*) and Sheaths Spots Complex (*Rhizoctonia oryzae*, *R. oryzae-sativae* and *R. solani*). These pathogens survive as sclerotia in the soil. Tools for diseases control are limited because genotypes do not have genetic resistance and available fungicides provide a partial control and generate a threat to the environment. Sustainable management is demanding tools more harmless. The objective of this work was characterized six isolates of fluorescent *Pseudomonas* with biocontrol potential on *R. oryzae*, *R. solani* and *S. oryzae*. The isolates were characterized for production of diffusible, volatile metabolites, HCN, siderophores and proteases as potential mechanisms of action. Furthermore were identified at species and strain level with molecular markers. Then, the effect of isolates on sclerotial germination and seed germination were evaluated *in vitro*. All isolates produced more than one potential mechanism, although the isolate called M1C was highlighted by the effectiveness of its metabolites for biocontrol. All isolates were identified as *Pseudomonas fluorescens* and three strains were differenced based on molecular characterization. All strains reduced the sclerotial germination of *R. oryzae* between 80-100%, M1C reduced 40% sclerotial germination of *S. oryzae*, but none affected sclerotial germination of *R. solani*. Furthermore all strains reduced the fungal growth on seeds, without improving the germination percentage. By the attributes of the M1C, is proposed as candidate strain with biocontrol potential for additional researches. This work provides valuable information about the possibility of using *P. fluorescens* to control of SSD in Argentina.

**Keys words:** rice, diseases, biological control, *Sclerotium oryzae*, *Rhizoctonia spp.*, *Pseudomonas*, Sheaths spots. Stem rot. SSD.

# **CAPÍTULO N° 1**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Origen e historia del arroz

En el mundo existen más de 20 variedades de *Oryza* pero solamente se cultivan dos: *Oryza sativa*, originaria del trópico húmedo de Asia, y *O. glaberrima* de África Occidental (Te-Tzu Chang 2003). La planta de arroz de *Oryza sativa* L. tuvo su origen como una gramínea salvaje hace más de 130 millones de años, mientras que su domesticación ocurrió hace más de 10.000 años. Los primeros libros establecen que India fue el primer país donde se cultivó, debido a que abundaban los arrozeros silvestres. Sin embargo, el desarrollo del cultivo tuvo lugar en China, desde sus tierras bajas a las altas.

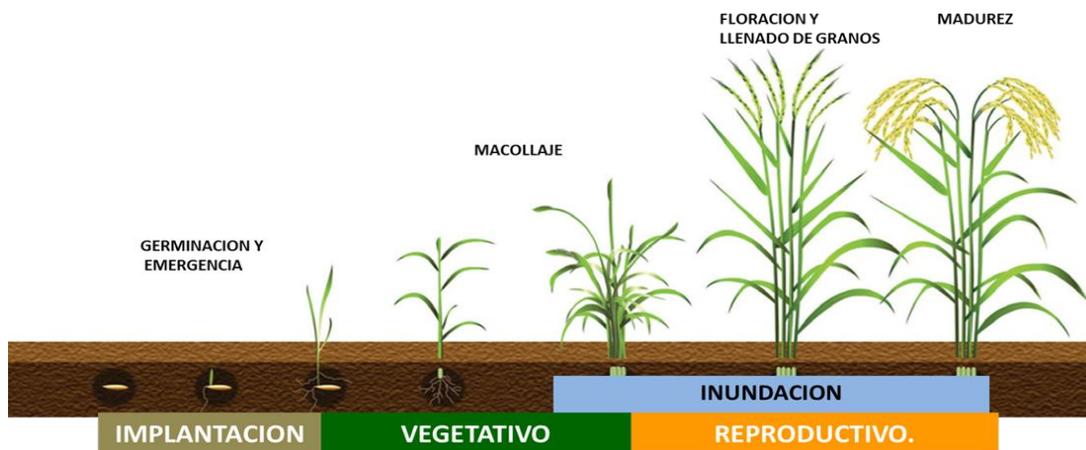
El arroz asiático cultivado ha evolucionado en tres razas ecogeográficas: *índica*, *japónica* y *javánica*. *Indica* reúne a las variedades tropicales y subtropicales cultivadas en el sur y sureste de Asia y Sur de China y *japónica* a las variedades con granos pequeños y redondeados de las zonas templadas de China, Japón y Corea. En tanto que *javánica* reúne a las variedades con granos de arroz aristados y sin aristas, con panículas largas y granos bien delineados que crecen en las regiones índicas en Indonesia (FAO 2004).

El cultivo de arroz se produce en un amplio rango de condiciones geográficas y ecológicas. Se cultiva en latitudes que van desde 53 ° Norte a 35 ° Sur y en altitudes que varían desde 1.500 metros sobre el nivel del mar hasta más de 4.0 metros bajo el nivel del mar. A raíz de ello es considerado el cultivo de mayor difusión mundial (Nayar 2014).

### 1.2. Tecnología de la producción de arroz

El arroz es un cultivo anual de verano y es el único cereal que puede sobrevivir períodos de sumersión en agua, gracias a las estrategias de adaptación que han desarrollado las plantas a lo largo de siglos (FAO 2004).

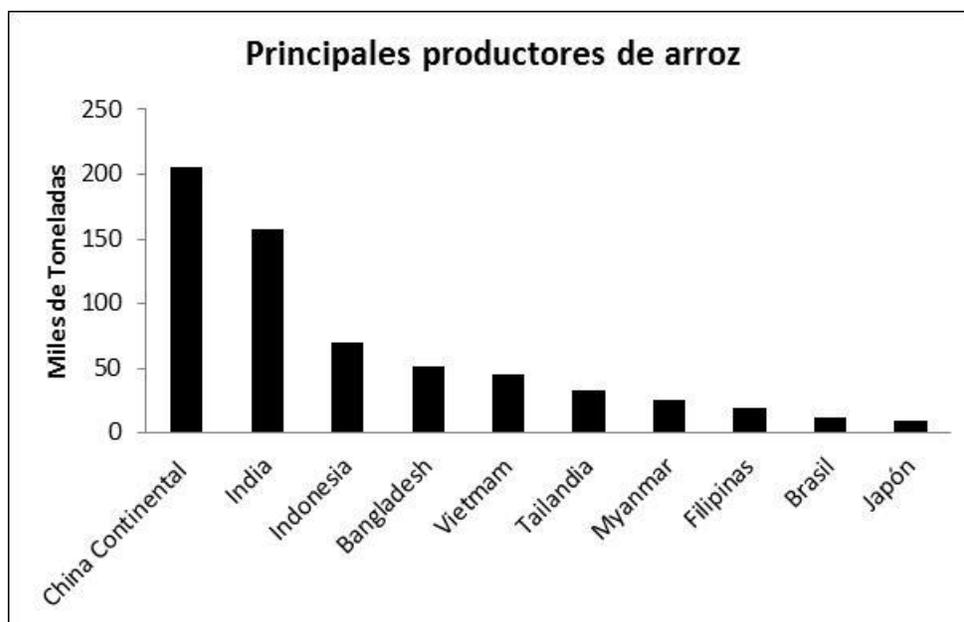
Según Counce et al. (2000) el cultivo atraviesa tres fases principales de desarrollo: de plántula, vegetativo y reproductivo. El desarrollo de plántula incluye desde la semilla, previo a imbibición ( $S_0$ ), emergencia de radícula y de coleoptile desde la semilla ( $S_1$  y  $S_2$ ) y emergencia de plúmula u hoja rudimentaria desde el coleoptile ( $S_3$ ). La fase de desarrollo vegetativo comienza con la emergencia de la primera hoja verdadera ( $V_1$ ) y se extiende hasta  $V_n$ , siendo  $n$  el número final de hojas con collar sobre el tallo principal. La fase de desarrollo reproductivo incluye diez estados basados en criterios morfológicos discretos, desde iniciación de panoja ( $R_0$ ) hasta madurez completa de panoja ( $R_9$ ). (Fig. 1.1).



**Figura 1.1.** Estados fenológicos del cultivo de arroz (adaptado de Counce et al. 2000).

### 1.3. Importancia del arroz en el mundo

El arroz es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial. Es el segundo cereal de mayor consumo en el mundo (396 millones de toneladas/año de arroz elaborado) y su producción mundial alcanza los 495 millones de toneladas/año de arroz elaborado (FAO 2016). Más del 85% de la producción está geográficamente concentrada en Asia. China, India, Indonesia, Bangladesh, Vietnam, Myanmar y Tailandia producen (Fig.1.2) y consumen el 80% de la producción global (120 kg/hab/año (FAO 2014).



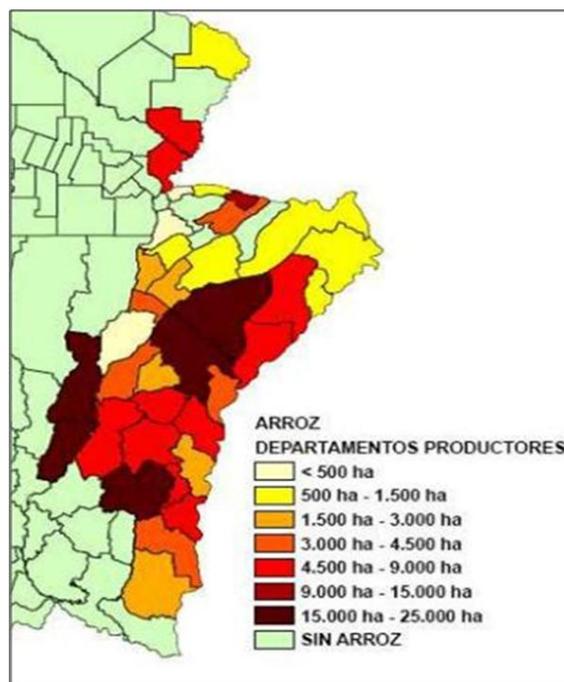
**Figura 1.2.** Principales productores de arroz mundial de arroz cáscara (millones de toneladas) en el período 2008-2014 (FAO 2014).

En el continente americano, los principales productores son Brasil, Estados Unidos, Perú, Colombia, Argentina y Uruguay. Brasil es el noveno productor del mundo (Fig.1.2) y el principal productor (8,3 millones de toneladas/año) y consumidor de arroz de arroz (43 kg/hab/año) en América latina (FAO 2014).

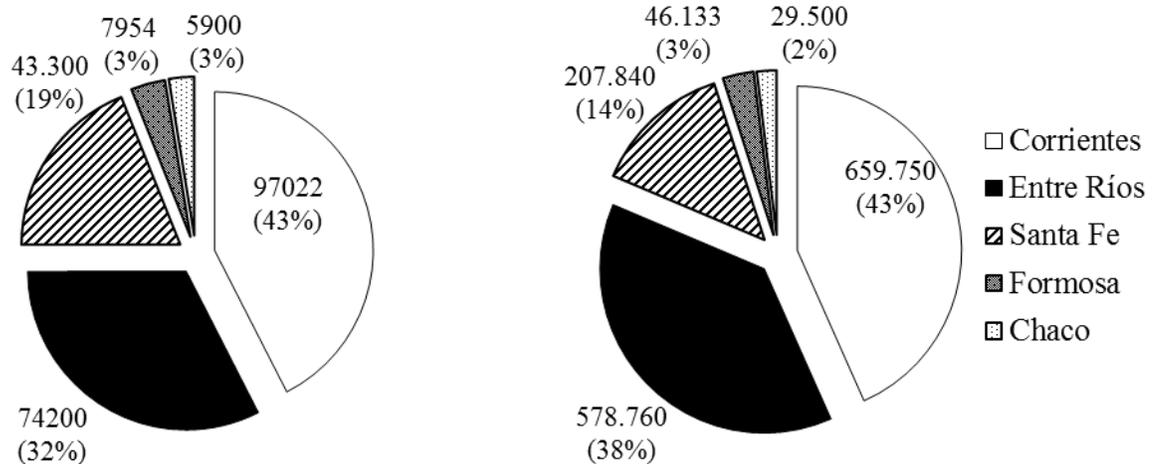
#### 1.4. Importancia económica de la actividad arrocera en Argentina

Nuestro país ocupa el cuarto puesto en cuanto a superficie sembrada y producción en América Latina, luego de Brasil, Colombia y Perú (fuente: Ruta de arroz 2014). La producción de arroz se concentra en la región del litoral comprendida por las provincias de Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Chaco y Formosa (Fig. 1.3 y Fig. 1.4 A). En las últimas campañas la producción nacional fue de aproximadamente 1.400.000 tn/año. Este cereal es la base de la economía regional de las provincias de Corrientes y Entre Ríos. Entre las dos producen más del 80 % de la producción nacional (Fig.1.4 B). Estas provincias poseen condiciones agrometeorológicas ideales, tierras aptas y cercanía a las fuentes de agua necesaria para el abastecimiento del cultivo.

El 40% de la producción argentina se consume en el mercado interno, aproximadamente 6 kg/hab/año, mientras que el 60% restante se exporta a mercados que demandan alta calidad. Los principales destinos de exportación son Brasil, Irak, Irán, Chile, Senegal y Bolivia (Fundación Proarroz 2014; Bolsa de cereales de Entre Ríos 2014).



**Figura 1.3.** Ubicación geográfica de las zonas productoras de arroz en Argentina (Adaptado de datos provistos por el Proyecto SIBER (Bolsa de Cereales de Entre Ríos 2014; Fundación Proarroz 2014; Asociación Correntina de Plantadores de Arroz (ACPA 2014))



**Figura 1.4. A)** Superficie sembrada por provincia en hectáreas y porcentaje de la superficie total. **B)** Producción nacional de arroz (tn) y porcentaje de la producción total por provincia. Campaña 2014/2015 (fuente: Fundación Proarroz 2015).

El rendimiento promedio anual del arroz fue 6,7 tn/ha en la campañas 2014/2015, respectivamente (ACPA 2015; Bolsa de Cereales de Entre Ríos 2015).

### 1.5. Sistemas de producción del cultivo de arroz en el mundo.

Existen cuatro agroecosistemas principales de cultivo de arroz en el mundo: arroz irrigado, arroz de secano, arroz en tierras bajas de clima lluvioso y arroz en tierras inundadas. Aproximadamente el 55% del total del arroz sembrado en el mundo pertenece al agroecosistema de arroz irrigado, y de allí se obtiene el 75% de la producción mundial.

El arroz de secano se cultiva sin riego y es tradicional en localidades con abundantes precipitaciones y suelos profundos. El área sembrada perteneciente a este sistema es de aproximadamente 16 millones de hectáreas (12%), siendo el de mayor superficie en América Latina. El agroecosistema de tierras bajas de clima lluvioso cubre el 25% del área sembrada con arroz en el mundo y ocupa tierras cuyas características de impermeabilidad permiten retener el agua proveniente de las abundantes precipitaciones que ocurren durante el ciclo de crecimiento del arroz. El agroecosistema de las tierras inundables a lo largo de los deltas de ríos ocupa la menor superficie, permanecen inundados por períodos prolongados, con profundidades que alcanzan los 3 m en cierta época del ciclo del cultivo (Quinteros 2009).

#### 1.5.1. Sistemas de producción en Argentina

En nuestro país el cultivo de arroz se realiza en su totalidad bajo condiciones de riego por inundación. Este sistema es similar al utilizado por Estados Unidos, Australia, España, Uruguay y Sur de Brasil. Es un cultivo totalmente mecanizado, cuya siembra se realiza en secano sobre terreno sistematizado, con construcción de taipas (bordes o melgas en contorno). A los 30-40 días desde la emergencia, se realizan uno o dos riegos denominados “baños”, en aquellas zonas donde no son suficientes las precipitaciones para

asegurar una buena implantación. Esa lámina de agua de 5-10 cm se mantiene durante aproximadamente 100 días, desde el inicio del macollaje hasta unos días previos a la cosecha (Gregori 2010).

El agua para riego proviene de dos fuentes principales, pozos profundos (principalmente en centro sur de Entre Ríos) y represas (en el Norte de Entre Ríos y Corrientes) (Benavidez 2006). El régimen pluviométrico normal del área arroceras argentina no es suficiente para que el cultivo permanezca inundado los 100 días necesarios para una producción eficiente. Por lo tanto, el riego es un insumo clave en los costos de la producción de arroz.

La cosecha se realiza en forma mecánica, en general con el suelo saturado o muy húmedo, lo que genera grandes huellas de los tractores y carros utilizados para transportar el cereal dentro del lote o chacra. Es frecuente que el rastrojo sea aprovechado para el pastoreo directo, que se siembren pasturas con avión o se quemé parcialmente el rastrojo y se laboree inmediatamente (Quinteros 2009). En algunas ocasiones se realizan rotaciones con pasturas o soja ya que el suelo pesado no permite otro tipo de cultivos (Benavidez 2006).

## **1.6. Causa e importancia de las pérdidas por enfermedades en el cultivo de arroz**

Las enfermedades de tallo y de vaina de arroz (ETV) se encuentran distribuidas en todas las regiones de arroz irrigado del mundo, provocando pérdidas de rendimiento que oscilan entre 5 y 80% para pudriciones de tallo (PT) (Ou 1985; Cother y Nicol 1999) y entre 10 y 50% para manchado de vainas (MV) (Gunnell y Webster 1984; Lanoiselet et al. 2001; Savary et al. 2001; Miller y Webster 2001; Lanoiselet et al. 2005; Ávila y Deambrossi 2004).

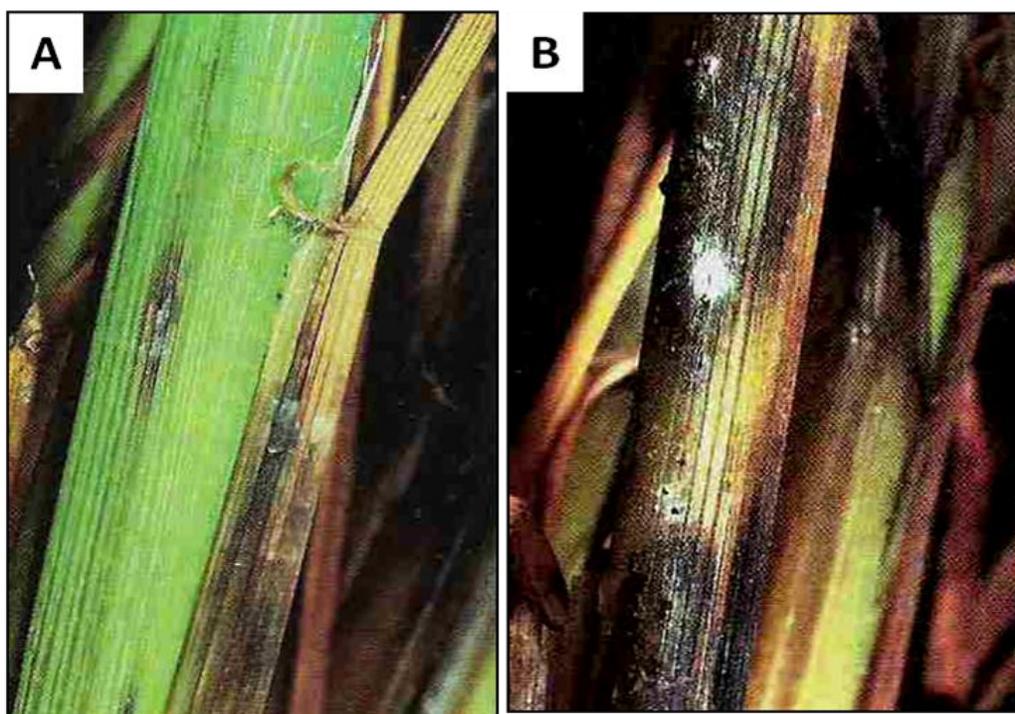
En Argentina, la prevalencia de estas enfermedades es muy alta. Pedraza (2005) observó que el 53% de lotes representativos de la región arroceras (Entre Ríos, Chaco, Santa Fe y Corrientes) presentó ETV, con un 58% de MV y un 16% de PT, el resto correspondió a otras enfermedades.

La PT, presente en todos los lotes de Corrientes, tiene una incidencia del 35% (Gutiérrez y Cúndom 2008). En Entre Ríos es la segunda enfermedad de mayor importancia siendo su nivel de incidencia superior al 50%, presentándose en el 60% de los lotes (Pedraza 2005). En estos últimos años, esta enfermedad se ha intensificado además en la provincia de Santa Fe causando severos daños (Pedraza, comunicación personal). Por su parte, el MV se encuentra presente en toda la región arroceras. Gutiérrez y Cúndom (2008) determinaron una prevalencia del 100% con incidencia de hasta 23% en Corrientes. En el 2005, Pedraza determinó que las especies más frecuentes en las arroceras en nuestro país fueron: *Rhizoctonia oryzae* (75%), *R. oryzae-sativae* (25%) y de *R. solani* (5%).

## **1.7. Ciclo de los patógenos: Etiología, Distribución y Dispersión**

Los agentes causales de las ETV son hongos necrotróficos que habitan en el suelo y pueden permanecer en la superficie o sobre rastrojos como micelio o esclerocios durante la ausencia del cultivo. La principal fuente de inóculo inicial son los esclerocios que se producen durante el ciclo del cultivo y caen al suelo al momento de la cosecha. Estas estructuras son capaces de permanecer en el suelo por periodos prolongados incrementando su población luego de varios ciclos de cultivo (Ou 1985).

La Pudrición del Tallo (PT) es causada por *Sclerotium oryzae* (estado esclerotial de *Magnaphorthe salvinii* Catt). Su ciclo se inicia cuando los esclerocios y micelio que se encuentran en el suelo, se ponen en contacto con las vainas externas de la planta a la altura de la línea del agua, germinan e infectan produciendo pequeñas lesiones oscuras en la base del tallo (Fig. 1.5 A). A medida que avanza la enfermedad, estas manchas progresan generando lesiones más grandes (Fig. 1.5 B) y el hongo penetra al interior del tallo pudiendo destruir la médula (Fig. 1.5 C). Sobre esas lesiones y en el interior del tallo, el hongo produce esclerocios que se diseminan con el agua de riego e infectan a los tejidos de las plantas adyacentes (Fig. 1.5 D). Esta enfermedad se manifiesta de manera generalizada en el lote (Fig.1.5 E). El período más susceptible del cultivo es la elongación de entrenudos y los daños más severos pueden llegar a producir vuelco de plantas (Fig. 1.5 F) y consecuente pérdidas de rendimiento (Webster 1992).

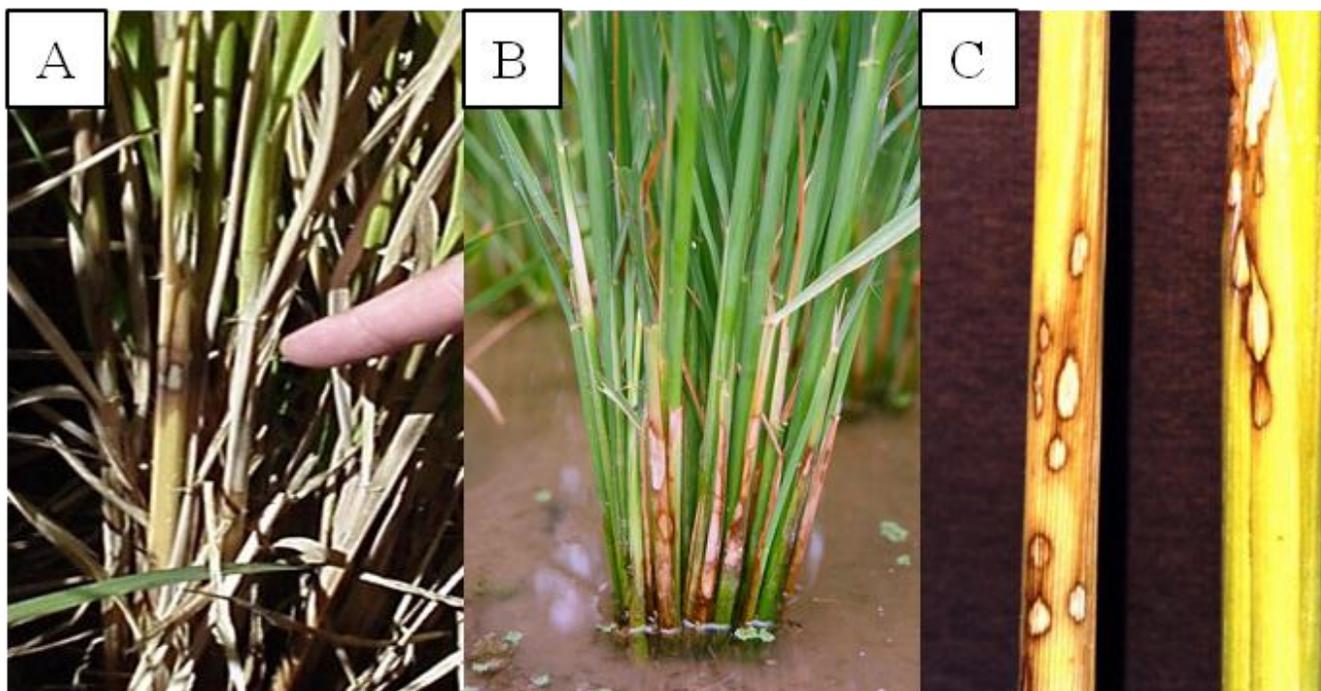




**Figura 1.5.** Síntomas de la Pudrición del Tallo. A). Lesiones iniciales sobre las vainas externas. B). lesiones negras con formación de micelio sobre las manchas. C). Manchas negras en el interior del tallo y formación de micelio sobre las mismas. D). Formación de esclerocios y destrucción total de la médula. E). Síntomas de PT en el campo. F). vuelco por *S. oryzae* (adaptado de Internacional Rice Research Institute (IRRI); Pedraza et al. 2009).

El Manchado de Vainas (MV) es causado por el “complejo *Rhizoctonia*”, integrado por las especies *R. oryzae*, *R. solani* y *R. oryzae-sativae*. Su ciclo se inicia cuando los

esclerocios y el micelio se ponen en contacto con las vainas externas de la planta a la altura de la línea del agua. El ciclo de la enfermedad tiene dos fases: una vertical, que se inicia sobre los tejidos inferiores de la planta y se desarrolla hacia la zona apical produciendo manchas a lo largo de todas las vainas de la planta. En la fase horizontal el micelio infectivo llega hacia las hojas de las plantas adyacentes comenzando el contagio entre plantas (Fig. 1.6) (Rush 1992). Los síntomas producidos por las tres especies son muy similares (Fig. 1.7), producen manchas en las vainas externas, hojas y panícula. Como consecuencia, se reduce el área fotosintética y puede afectarse el llenado de granos. La manifestación de los síntomas se produce a mediados de macollaje y la distribución es en forma de manchones dentro del lote (Ou 1985; Lanoiselet et al. 2007).



**Figura 1.6.** Síntomas de Manchado de vainas por A). *R. oryzae*. B). *R. solani* y C). *R. oryzae-sativae*. (Adaptado de Pedraza et al. 2009 y de IRRI).



## 1.8. Manejo de ETV

El principal problema para controlar las ETV es la dificultad para disminuir el inóculo inicial presente en el suelo y en el rastrojo. Para ello existen diferentes herramientas:

### 1.8.1. Resistencia genética

El desarrollo de resistencia genética para estas enfermedades resulta muy laborioso debido a la baja heredabilidad de la misma. Se han identificado cultivares con distinto grado de tolerancia a *Rhizoctonia* spp. Los cultivares semienanos muestran mayor susceptibilidad a esta enfermedad en comparación a los cultivares más altos, debido a que los primeros tienen mayor capacidad de macollar y cerrar el surco, generando condiciones de humedad y temperatura favorables para el desarrollo del MV por debajo del canopeo (Gunnell y Webster 1984; Miller y Webster 2001; Prabhu et al. 2002).

Asimismo, para PT, se ha encontrado variabilidad en el comportamiento de genotipos frente a la enfermedad, desde altamente susceptibles hasta moderadamente resistentes, pero no se ha encontrado resistencia absoluta (Ferreira y Webster 1976; Cother y Nicol 1999; Kumar et al. 2003; Blanco et al. 2004; Pedraza y Asselborn 2014).

### 1.8.2. Prácticas agronómicas

La quema del rastrojo al finalizar la estación de cultivo o durante el invierno es una de las prácticas más antiguas. En regiones de Estados Unidos y Australia, se ha utilizado esta práctica para disminuir el inóculo inicial de PT y MV (Webster y Bockus 1978; Cintas y Webster 2001; Miller y Webster 2001). Sin embargo, estudios *in vitro* demostraron que los esclerocios de *Rhizoctonia* pueden sobrevivir a temperaturas elevadas (Lanoiselet et al. 2005b). Por otro lado, esta técnica produce efectos perjudiciales para el ambiente por lo cual no sería adecuada.

Considerando lo anterior, una posibilidad es enterrar el rastrojo luego de la cosecha e inundar el lote durante el invierno (Cintas y Webster 2001). Esta práctica puede no ser rentable debido a los altos costos del riego (Garrido Rondoy 2009).

El manejo del riego y de la fertilización afecta el desarrollo de las ETV. Pedraza et al. (2007) demostraron que por un lado, el riego intermitente durante el ciclo de cultivo ayuda a controlar la incidencia de PT, en comparación al riego permanente utilizado de manera convencional. Por otro lado, el uso de dosis bajas de nitrógeno no permite el desarrollo abundante de macollaje, lo cual evita la propagación de MV (Cu et al. 1996; Pedraza et al. 2007). Sin embargo, ambas condiciones no permiten alcanzar rendimientos estables del cultivo.

### 1.8.3. Fungicidas

La aplicación de fungicidas es una de las alternativas de manejo de ETV. No obstante, si bien se logra reducir los niveles de ETV en el campo, los resultados son erráticos y no siempre se detectan incrementos en el rendimiento (Jackson et al. 1977; Ávila et al. 2004; Lanoiselet et al. 2005a; Ávila y Deambrosi 2006). En Argentina, Pedraza y Asselborn (2006) encontraron que mezclas de estrobilurinas y triazoles disminuyeron un 25,5 % el nivel de PT, mientras que para MV no se encontraron diferencias entre los tratamientos. Por

lo tanto, los fungicidas presentan un control parcial de ETV y además, su utilización excesiva pone en riesgo la estabilidad del ambiente.

#### 1.8.4. Control Biológico

En los últimos años, las preocupaciones ambientales y sanitarias por el uso desmedido de agroquímicos, la ineficiencia en técnicas de irrigación y aplicación de fertilizantes, han generado serios cuestionamientos sobre la sostenibilidad a largo plazo de los sistemas de producción agrícola modernos. Frente a estas limitaciones y a la necesidad de desarrollar prácticas que permitan una agricultura sustentable, muchas investigaciones han sido orientadas hacia el uso del control biológico de patógenos (Gnanamanickam 2002).

El control biológico de patógenos ha sido definido como la reducción de la densidad del inóculo de un patógeno en su estado activo o de dormición, por uno o más organismos. El biocontrol puede lograrse naturalmente o por la introducción de uno o más microorganismos con capacidad antagonista (Baker y Cook 1974). Según Agrios (2005) es “la destrucción total o parcial de la población del patógeno por medio de otros organismos”.

Existen agentes de control biológico (ACBs) de origen fúngico y bacteriano. Ambos poseen numerosos mecanismos asociados al control de patógenos de plantas. Algunos de los mecanismos más conocidos son la competencia directa por espacio o nutrientes; el micoparasitismo; la inhibición del crecimiento mediante la producción de metabolitos secundarios y la inducción de resistencia (Baker y Cook 1974; Gnanamanickam 2002; Weller 2007; Lucas et al. 2014). Además, muchos de esos ACBs son usados también como promotores directos del crecimiento vegetal, contribuyendo a mejorar el crecimiento y la salud de la planta (Weller 2007; Anitha y Das 2011).

##### 1.8.4.1. Bioagentes fúngicos

Se han publicado diversos trabajos sobre el uso de ACBs fúngicos para el control de *R. solani* en arroz. Castro da Silva et al. (2012) demostraron reducciones de la severidad de *R. solani* en 43%, con aplicaciones foliares de *Trichoderma spp.* en invernáculo. Duan et al. (2007), demostraron que los metabolitos producidos por *Helminthosporium graminearum* lograron disminuir el crecimiento de *R. solani in vitro* y el desarrollo de la enfermedad en el campo. También trabajos de Martínez et al. (2008) y Naeimi et al. (2011) reportaron que el crecimiento *in vitro* de *R. solani* fue inhibido por cepas del género *Trichoderma* y que disminuyó la incidencia de *R. solani* cuando se aplicó *Trichoderma* en condiciones de campo.

##### 1.8.4.2. Bioagentes bacterianos

Diversos géneros bacterianos han sido evaluados como ACBs bajo diferentes condiciones y en distintos cultivos para el control de hongos patógenos. Por ejemplo, Hernández et al. (2004) demostraron que una misma cepa de *Pseudomonas fluorescens* puede utilizar distintos mecanismos para controlar *R. solani* en maíz. Arora et al. (2008) concluyeron que cuando cepas de *Pseudomonas* fluorescentes, que producían *in vitro* enzimas hidrolíticas, cianuro de hidrógeno y sideróforos, se aplicaban sobre las semillas, promovían el crecimiento de plantas de arveja en cámaras de cría y disminuían la incidencia de *R. solani*. En otros estudios se demostró que cepas de *Bacillus spp.* resultaron efectivas en ensayos en invernáculo para el control de *R. solani* en tomate (Montealegre et al. 2003).

En arroz se han evaluado diferentes géneros bacterianos como antagonistas de patógenos. Entre ellos, *Streptomyces*, *Bacillus* y *Pseudomonas* mostraron efecto de inhibición sobre el crecimiento de *Pyricularia oryzae*, *Dreschlera oryzae*, *R. solani* *Alternaria* sp. *Fusarium oxysporium* y *S. oryzae*, tanto en laboratorio como en invernáculo (Kazempour 2004; Prabavathy et al. 2006; Naureen et al. 2009; Chaiharn et al. 2009).

*Pseudomonas* es uno de los géneros más estudiados como ACB y como promotor del crecimiento vegetal (Haas y Défago 2005; Weller 2007; Coullierot et al. 2009). Este género presenta varias ventajas para el control de patógenos de arroz. Entre ellas, ser habitantes naturales del suelo, adaptarse a diversas condiciones ambientales y poseer habilidad para colonizar rápidamente la rizósfera. Además, tienen bajos requerimientos nutricionales y están involucradas en el concepto de supresión natural de suelos. El género *Pseudomonas* se divide en cinco grupos basados en la secuencia del 16S rDNA (Palleroni 2008). El grupo I, llamado *Pseudomonas sensu stricto*, incluye a todas las fluorescentes, con habilidad para producir el sideróforo fluorescente pioverdina (O'Sullivan y O'Gara 1992). A este grupo pertenecen *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. aeruginosa* (Bossis et al. 2000). *P. fluorescens* está adaptada a sobrevivir en suelos y colonizar las raíces de las plantas. Se ha aislado de un amplio rango de suelos, de diversos hospedantes y bajo diferentes condiciones (Rezzonico et al. 2007). Ciertas cepas forman microcolonias o biofilms en la superficie radicular entre las células epidérmicas. Otras tienen la capacidad de colonizar el interior de la raíz y son efectivas en la utilización de los exudados radicales para crecer y colonizar agresivamente la rizósfera (Lawongsa et al. 2008; Coullierot et al. 2009).

En el cultivo de arroz, investigaciones de Gnanamanickam y Mew (1992); Rives et al. (2009); Hernández et al. (2010) demostraron que cepas nativas de *P. putida* y *P. fluorescens* produjeron un efecto de biocontrol sobre *P. grisea* y *Curvularia* sp. en condiciones *in vitro* y en invernáculo. Por otro lado, Kazempour (2004), reportó disminuciones en la incidencia de *R. solani* en condiciones semicontroladas y en el campo, mientras que Vasudevan et al. (2002) mostraron que tratamientos de *P. fluorescens* aplicados a la semilla y a las plantas de arroz antes de la inoculación con el patógeno, redujeron la severidad de *Sarocladium oryzae* entre un 20 y 42% en invernáculo y en el campo, respectivamente. Además, existen antecedentes sobre la efectividad de cepas de *P. fluorescens* para disminuir la germinación de los esclerocios de *R. solani* (Kazempour 2004).

#### 1.8.4.3. Uso de combinaciones de ACBs

La combinación de antagonistas con diferentes requerimientos, patrones de colonización y mecanismos de acción resulta ventajoso para cubrir la variedad de condiciones microambientales que suceden en un cultivo a campo. Esta posibilidad ha sido evaluada en varios cultivos, entre ellos, arveja (Dandurand et al. 1997), tomate (Datnoff et al. 1995) y trigo (Duffy et al. 1996). Dentro de las combinaciones evaluadas se han ensayado las de diferentes cepas de bacterias (Rapauch y Kloepper 1998), cepas de hongos (Datnoff et al. 1995) o combinaciones de hongos y bacterias.

En arroz, Mathivanan et al. (2005) informaron un mayor control a campo del tizón de la vaina causado por *R. solani* cuando se aplicaron en forma conjunta cepas de *P. fluorescens* y *T. viride*. Otras investigaciones realizadas por Saravanakumar et al. (2009)

reportaron que mezclas de cepas de *Pseudomonas* redujeron entre un 58 y 64% la severidad de *Sarocladium oryzae* en invernáculo y entre un 81 y 86% en el campo.

### 1.9. Antecedentes de uso de agentes microbianos en Argentina

En Argentina, el género *Pseudomonas* ha sido evaluado en condiciones controladas y de campo en los cultivos más importantes, tanto como promotor del crecimiento (PGPR) como ACB, obteniéndose resultados diversos. Rosas et al. (2012) demostraron que la cepa *SRI* de *P. aurantiaca* aislada de rizósfera de soja incrementó el rendimiento de maíz y trigo cuando se aplicó como inoculante a la semilla en condiciones de campo. Naiman et al. (2009) inocularon semillas de trigo con mezclas de *Pseudomonas* y *Azospirillum* y obtuvieron un incremento del 12 % en la biomasa aérea, 40 % en la biomasa radicular y 16% en el rendimiento.

#### 1.9.1 Antecedentes de uso de agentes microbianos en arroz

Se han evaluado diferentes microorganismos como PGPR de arroz en condiciones de campo. Puente et al. (2013) inocularon semillas de la variedad Cambá con cepas de *Azospirillum* y obtuvieron incrementos en la longitud del vástago y raíz en condiciones controladas e incrementos del rendimiento de 5,8% en ensayos a campo. García de Salomone et al. (2010 y 2011) encontraron que una cepa de *Azospirillum brasilense* incrementó la biomasa y el rendimiento de arroz en condiciones de campo. En otro trabajo del mismo autor se evaluó la combinación de *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum* sp. como PGPR en condiciones de campo, obteniéndose incrementos en la biomasa y el rendimiento con relación al cultivo sin tratar (García de Salomone et al. 2012). Nico et al. (2011) encontraron que cepas de *Serratia* sp. y *Pseudomonas* sp que solubilizaban fósforo incrementaron la longitud de raíces y brotes de arroz.

Desde el año 2007, en el INTA EEA Concepción del Uruguay, se comenzó a investigar sobre la posibilidad de la aplicación del control biológico de enfermedades fúngicas en arroz. Se realizaron más de 100 aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes provenientes de la rizósfera de arroz y de suelos de arrozceras de Entre Ríos y Chaco. Estos aislamientos fueron evaluados *in vitro* frente a patógenos causantes de PT y MV. Del total de estos aislamientos, catorce mostraron la mayor capacidad antagónica en cultivos duales bacteria-hongo. Los aislamientos fueron preseleccionados para ser evaluados frente a PT en microparcelas en el campo. Como resultado de este ensayo, 6 aislamientos combinados de *Pseudomonas* de Entre Ríos, lograron reducir la incidencia de PT entre un 57-75% y un 30% a los 76 y 94 días después de la siembra, respectivamente (Pedraza et al. 2009).

Durante el periodo 2008/2009 este grupo combinado de seis cepas, fue aplicado en suspensiones acuosas en macroparcelas en el campo, lográndose una reducción del 40 y 70% de las enfermedades PT y MV, respectivamente (Pedraza et al. 2008 y 2009).

### 1.10. Fundamento de la elección del tema de tesis

Sobre la base de los resultados de Pedraza et al. (2008 y 2009) es posible considerar al uso del control biológico de PT y MV en arroz en el marco de un manejo integrado de enfermedades. A partir de dicha información se pretende profundizar en la caracterización de los aislamientos en forma individual, determinando sus mecanismos potenciales de acción y su identificación. Dichos pasos son fundamentales para el desarrollo de

formulados biológicos que puedan utilizarse como potencial herramienta a sumar en el manejo integrado de enfermedades del cultivo.

De acuerdo a los antecedentes expuestos se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos.

### **1.11. Objetivos e hipótesis**

#### *Objetivo general*

Generar conocimiento para el control biológico de las enfermedades de tallo y de vaina de arroz en Argentina, como herramienta a sumar en el manejo integrado de enfermedades del cultivo.

#### *Objetivos específicos*

1. Determinar la capacidad de los aislamientos nativos de producir compuestos antifúngicos difusibles, sustancias antifúngicas volátiles, especialmente su capacidad para producir HCN, sideróforos y enzimas hidrolíticas.
2. Relacionar dichas capacidades con la actividad biocontroladora *in vitro* del crecimiento del micelio de *S. oryzae*, *R. oryzae*, *R. solani* y *R. oryzae-sativae*, agentes causales de la PT y el MV en arroz.
3. Identificar y clasificar por taxonomía molecular a los seis aislamientos nativos.
4. Evaluar el efecto de las cepas bacterianas sobre la germinación de los esclerocios de los patógenos.
5. Evaluar el efecto del tratamiento de las cepas bacterianas en las semillas.

#### *Hipotesis de la investigación*

1. La capacidad biocontroladora, demostrada por los aislamientos, se debe a uno o más de los siguientes mecanismos: la producción de compuestos difusibles, volátiles, HCN, sideróforos y/o enzimas hidrolíticas.
2. Los aislamientos previamente caracterizados pertenecen a diferentes especies de *Pseudomonas* fluorescentes.
3. Las cepas bacterianas afectarán la germinación de los esclerocios de *R. oryzae*, *R. oryzae-sativae*, *R. solani* o *S. oryzae*.
4. La aplicación de algunas de las cepas bacterianas reducirá el desarrollo microbiano en las semillas

## **CAPÍTULO N° 2.**

# **DETERMINACIÓN DE MECANISMOS POTENCIALES DE ACCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS NATIVOS DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES**

---

## 2.1. INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más importantes al momento de seleccionar un agente de control biológico (ACB) es conocer cuáles son los mecanismos que utilizan para ejercer su control sobre los patógenos. Dicha información es esencial para lograr un desarrollo exitoso del control biológico como estrategia de manejo de las enfermedades (Cook et al. 1995; Gnanamanickam y Mew 2002). El principal objetivo de la aplicación de un ACB es suprimir la acción de un patógeno o al menos disminuir su efecto deletéreo. Cuando una bacteria o un hongo actúan como ACB, su efecto antagónico es el resultado de la acción de uno o varios de los mecanismos de acción que poseen (Gnanamanickam y Mew 2002; Weller 2007). La utilización de varios mecanismos de acción para contrarrestar el crecimiento de los patógenos genera una ventaja competitiva a la hora de seleccionar el ACB porque asegura un mayor espectro de control. Sin embargo, esa capacidad depende no solamente de la cepa biocontroladora, sino también del patógeno a controlar, del cultivo y de las condiciones ambientales (entre ellos, pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes) (Weller 2007).

Los mecanismos de acción de un ACB se pueden clasificar en directos o indirectos.

Los mecanismos de acción directa son aquellos que por sí solos pueden inhibir el crecimiento del patógeno o provocar directamente su muerte. Entre ellos se encuentran la competencia por nutrientes y espacio, la producción de enzimas hidrolíticas que degradan componentes de la pared celular del patógeno, la producción de metabolitos secundarios entre los cuales se encuentran compuestos difusibles como el 2, 4 diacetilfloroglucinol (DAPG); pirrolnitritinas (Raaijmakers y Weller 2001) y fenacinas (Thomashow y Weller 1988), y metabolitos volátiles como el cianuro de hidrógeno (HCN) (Castric y Castric 1983).

Los mecanismos de biocontrol indirectos son los que ejercen su acción a través de la interacción directa con la planta, activando su sistema de defensa y generando un estado de resistencia inducida a los patógenos. De esta manera los microorganismos contribuyen a mejorar el crecimiento y la salud de la planta (Chen et al. 1999; Viswanathan 2002; Weller 2007).

Dentro de los mecanismos que poseen las bacterias del género *Pseudomonas* colonizadoras de raíces se encuentran la producción de metabolitos antifúngicos (Mazzola et al. 1992; O'Sullivan y O'Gara 1992; Siddiqui y Shaukat 2003), sideróforos (Neilands 1993) y de estimuladores del crecimiento vegetal como el ácido 3-indol acético (AIA) (Weller 2007) entre otros.

A continuación se describirán sintéticamente los mecanismos anteriormente nombrados.

### 2.1.1. Competencia por nutrientes y espacio

Este mecanismo hace referencia a la competencia que pueden generar los ACBs con los patógenos por fuentes de carbono, nitrógeno o hierro en condiciones limitantes. La habilidad de utilizar diversas fuentes de carbono o de aprovechar otras fuentes no utilizadas por los competidores ha sido correlacionada con la capacidad de colonizar más rápidamente la rizósfera y el filoplano (O'Sullivan y O'Gara 1992; Weller 2007).

### 2.1.2. Producción de metabolitos secundarios antifúngicos

Las bacterias pueden sintetizar una gran diversidad de metabolitos secundarios durante la fase estacionaria de crecimiento. Estos metabolitos, difusibles y/o volátiles, tienen la capacidad de interferir en procesos metabólicos importantes de los patógenos, entre ellos, la respiración. Dentro de los compuestos difusibles, los más estudiados son los antibióticos 2, 4 DAPG; las pirrolnitrinas (Raaijmakers et al. 1999), fenacinas (Thomashow y Weller 1988), entre otros. Entre los metabolitos volátiles existen los aldehídos, aromáticos y HCN (cianuro de hidrógeno), este último es uno de los más importantes. Este gas interfiere en el proceso de respiración inhibiendo la enzima citocromo-oxidasa en la cadena de transporte de electrones (Weller 2007).

### 2.1.3. Producción de sideróforos

El hierro (Fe) es un nutriente esencial para muchos microorganismos, sin embargo su disponibilidad en los suelos es muy limitada debido a que se encuentra presente en estados iónicos poco solubles. Para poder sobrevivir en ambientes limitantes los microorganismos y las raíces de las plantas secretan compuestos quelantes de Fe de bajo peso molecular, denominados sideróforos. Estos compuestos forman un complejo con el ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) el cual se une a transportadores de la membrana celular que introducen el hierro en el interior de la célula (Neilands 1993). La competencia por el hierro a través de la producción de sideróforos es uno de los mecanismos más estudiados en bacterias colonizadoras de raíces con capacidad biocontroladora de patógenos. El grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes producen pigmentos amarillo verdoso, solubles en agua, compuestos por quinolina, responsable de la fluorescencia y una cadena peptídica de longitud variable de ácido hidroxámico. Estos sideróforos han sido clasificados como pioverdinas o pseudobactinas con una alta afinidad por el ion  $\text{Fe}^{3+}$  formando complejos y dejándolos no disponibles para otros microorganismos (O'sullivan y O'Gara 1992). La capacidad de formar estos sideróforos se ha asociado directamente con un mejor crecimiento de las plantas por aprovechamiento del complejo  $\text{Fe}^{3+}$  sideróforo (Neilands 1993).

### 2.1.4. Producción de enzimas hidrolíticas

La producción de enzimas extracelulares tales como proteasas y quitinasas es uno de los mecanismos de biocontrol directos más importantes. Estas enzimas actúan degradando los componentes de la pared celular del patógeno provocando su lisis celular y generando un estado de parasitismo de las células del patógeno. Las cepas productoras de estas enzimas colonizan rápidamente la zona radicular debido a la inhibición de patógenos en la rizósfera (Gupta et al. 2006).

Este capítulo abordará la determinación *in vitro* de los mecanismos potenciales de acción de seis aislamientos para inhibir el crecimiento de *R. oryzae*, *R. solani*, *R. oryzae-sativae* y *S. oryzae*. Para ello se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis de trabajo:

**Objetivos del capítulo**

1. Determinar la capacidad de los seis aislamientos de producir compuestos antifúngicos difusibles, sustancias antifúngicas volátiles, especialmente su capacidad para producir HCN, sideróforos y enzimas hidrolíticas.
2. 2. Relacionar dichas capacidades con la actividad biocontroladora *in vitro* sobre los patógenos de la PT y el MV en arroz.

**Hipótesis del capítulo**

1. La actividad biocontroladora demostrada por los seis aislamientos sobre *R. oryzae*, *R. oryzae-sativae*, *R. solani* o *S. oryzae*, se debe a uno o más de los siguientes mecanismos: la producción de compuestos difusibles, volátiles, HCN, sideróforos y/o enzimas hidrolíticas.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Aislamientos bacterianos

Se utilizaron los seis aislamientos obtenidos de la rizósfera de plantas sanas de arroz de la provincia de Entre Ríos (Cuadro 2.1). Los mismos fueron seleccionados en estudios previos, por su efecto de control en condiciones de laboratorio y en el campo (Pedraza et al. 2008 y 2009). Para todas las determinaciones se utilizaron cepas de referencia (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2. 1.** Listado de aislamientos y cepas patrones utilizados en las determinaciones moleculares y fenotípicas.

Cepa/Aislamiento	Fuente
M1A	Aislamientos nativos (M1) de <i>Pseudomonas</i> , de suelo de arrozceras de INTA EEA Concepción del Uruguay, y seleccionados por su efecto biocontrolador (Pedraza et al. 2008 y 2009).
M1B	
M1C	
M1E	
M1F	
M1G	
<i>P. fluorescens</i> Pf- 5	Cepas de referencias del Banco Nacional de Microorganismos del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (INBA-CONICET-FAUBA)
<i>P. aeruginosa</i> BNM292	
<i>P. putida</i> BNM291	
<i>P. fluorescens</i> BNM233	
<i>P. aurantiaca</i> 63Rc	UNJ
<i>E. coli</i> ATCC 25922	ATCC

**Referencias:** INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. EEA: Estación Experimental Agropecuaria. BNM: Banco Nacional de Microorganismos (INBA-CONICET/FAUBA), Argentina. UNJ: Universidad Nacional de Jujuy, Argentina. ATCC: American Type Culture Collection, USA.

#### 2.2.1.1. Preservación de los aislamientos

Previo a las determinaciones fenotípicas y moleculares, los cultivos puros de M1 fueron conservados por criopreservación y liofilización, a fin de evitar pérdidas irreparables. Estas técnicas permiten mantener intactas sus características genéticas y fisiológicas durante un largo periodo de tiempo.

Para realizar la crio-preservación con glicerol al 20% se cultivaron colonias puras de M1 en 50 ml de medio líquido King B (KB) y se incubaron a 28°C por 24 h, en oscuridad. Posteriormente, el cultivo fue cosechado por centrifugación a 5.000 rpm por 20 min (DAMON, Modelo IEC HT) y el sobrenadante fue descartado. El pellet resultante fue resuspendido en 5 ml de medio líquido KB suplementado con 20% glicerol. De la nueva

suspensión se distribuyeron 0,5 ml en tubos crioviales que se conservaron en freezer a -80°C.

Para liofilizar los aislamientos bacterianos se utilizaron cultivos puros incubados a 28°C por 24 h en medio KB. Posteriormente, el cultivo fue trasvasado bajo condiciones asépticas a tubo Falcon de 15 ml y centrifugado a 10.000 rpm, a 28°C, por 5 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet resultante fue resuspendido en 4 ml de medio de cultivo compuesto por peptona de caseína 5% p/v y sacarosa 10% p/v. Los aislamientos fueron conservados a -20°C por 48 h y posteriormente liofilizados bajo una presión de  $1,33 \times 10^{-3}$  mBar y -40°C de temperatura (Labconco Freeze Dry System/Freezone 6, KCK, USA). El producto de la liofilización fue redistribuido en viales de 2 ml. Se realizaron tres repeticiones de cada aislamiento para conservar en distintos lugares físicos (BNM y EEA-INTA Concepción del Uruguay), a los fines de evitar pérdida de alguno de los aislamientos.

Para las determinaciones de mecanismos los cultivos se activaron en medio líquido KB a 28°C, con agitación (150 rpm), por 24 h y en oscuridad. Se sembró 1 ml de cada aislamiento bacteriano activado para preparar el inóculo inicial en erlenmeyers con 10 ml de medio líquido KB, incubándose en las condiciones descriptas anteriormente.

### **2.2.2. Aislamientos fúngicos**

Los aislamientos de *R. oryzae*, *R. solani* y *S. oryzae*, utilizados para las determinaciones de acción de los metabolitos volátiles y compuestos difusibles pertenecen a la colección de patógenos de arroz del grupo de Fitopatología del INTA EEA Concepción del Uruguay. Los mismos se obtuvieron a partir de los síntomas de las enfermedades que producen en plantas de arroz y se conservaron en tubos de agar papa glucosa (APG) (Britania, Argentina), a temperatura ambiente. El aislamiento de *R. oryzae-sativae* se contaminó durante su periodo de conservación antes de los ensayos y no pudo ser recuperado. La activación de los cultivos se realizó en APG a 26°C durante 7 días y luz continua. Para los experimentos se partió de los cultivos previamente activados que se dejaron crecer en medio APG fresco durante 4 días.

### **2.2.3. Determinación de mecanismos de acción**

#### *2.2.3.1. Producción de compuestos difusibles*

Se siguió la metodología de Kazempour (2004). Para ello se colocaron discos de papel celofán en placas de Petri de 9 cm con APG. Posteriormente, sobre el papel celofán se sembraron 250 µl de la suspensión inicial del cultivo de 24 h de cada aislamiento bacteriano o de agua (tratamiento control). Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron en oscuridad por 48 h. Luego de ese tiempo el papel fue removido, colocándose en el centro de la placa un disco de 5 mm de micelio de cada patógeno (*R. oryzae*, *R. solani* y *S. oryzae*) crecido en medio APG. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 28°C por 5 días. Se realizaron tres ensayos independientes para los patógenos *R. oryzae* y *R. solani* (ensayos 1, 2 y 3) y dos ensayos para *S. oryzae* (ensayos 2 y 3). Cada ensayo tuvo tres repeticiones para cada combinación bacteria-patógeno.

#### 2.2.3.2. Producción de metabolitos volátiles

Se utilizó la metodología seguida por Kazempour (2004) con modificaciones. La prueba se realizó en placas de Petri. En las bases se volcaron 10 ml de APG, y en las tapas se volcaron 7 ml de KB. En cada base de la placa con APG se sembró un disco de 5 mm del patógeno. En la tapa de la placa con KB, se sembraron 200 µl de cultivo bacteriano de 24 h. El inóculo se distribuyó con espátula de Drigalsky sobre toda la superficie del medio. Posteriormente, las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 28°C, en oscuridad. Como control se incluyeron cultivos fúngicos sembrados sobre APG en la base de la placa y una alícuota de 200 µl de caldo KB estéril en la tapa. El diámetro de las colonias de los hongos patógenos se registró luego de 3, 6 y 9 días. Se realizaron dos ensayos independientes con tres repeticiones para cada combinación bacteria-patógeno.

#### 2.2.3.3. Producción de cianuro de hidrógeno (HCN)

La producción de HCN se evaluó siguiendo el método descrito por Ayyadurai et al. (2007), con modificaciones. Se sumergieron discos estériles de papel de filtro Whatman N°1 en solución al 1,2% de ácido pícrico (Cicarelli, Argentina) y se dejaron secar en ambiente seco y en oscuridad. Luego de 24 h se sembraron 200 µl de cada aislamiento en la base de una placa de Petri con medio KB suplementado con glicina (4,4 g/l). Los discos secos con ácido pícrico se embebieron en una solución al 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se colocaron en el interior de la tapa de la placa de Petri. Las placas fueron selladas con parafilm e incubadas a 28°C en oscuridad por 96 h. El cambio de color del papel de amarillo a marrón claro, oscuro o fuerte (marrón rojizo) es indicador de la reducción del picrato de sodio, y es proporcional a la cantidad de ácido cianhídrico presente. Luego de 96 h se registraron los aislamientos que indujeron un cambio (producción de HCN) o no de color en el papel. Como control negativo se utilizó un cultivo sin bacteria y como control positivo el inóculo de BNM233. El experimento se repitió 3 veces.

#### 2.2.3.4. Producción de sideróforos

La producción de sideróforos se evaluó a través de dos técnicas: siembra en medio agarizado y siembra en medio líquido. Para la primera técnica se utilizó el medio de cultivo denominado CAS (del inglés, Chrome Azurol S), desarrollado por Schwyn y Neilands (1987). Este medio contiene Fe (III) y el colorante cromo-azurol S formando un complejo. El cromo-azurol S puede ser agregado al medio agarizado o líquido. Esta prueba se basa en el cambio de color del azul intenso al naranja o púrpura cuando el ion férrico es removido por el sideróforo (Neilands 1993), alrededor del microorganismo productor. La determinación se realizó en placa de Petri conteniendo medio CAS agarizado sobre el cual se realizaron tres inoculaciones de 10 µl de cada aislamiento, que se dejaron secar bajo campana. Las placas se sellaron y se incubaron a 28°C por 48 h. Se realizaron dos ensayos independientes y cada tratamiento (cepa) tuvo tres repeticiones por ensayo. Se observó presencia o ausencia de cambio de color alrededor de la colonia. Como control positivo se utilizó la cepa BNM233.

La segunda técnica consistió en siembra de inóculo bacteriano en el medio líquido diferencial KB. Este medio es limitante en hierro, en él los cultivos positivos producen un pigmento verde amarillento denominado “pioverdina”, que tras ser observado bajo luz ultravioleta produce fluorescencia. Para ello se sembró 1 ml de cultivo activado en 10 ml de

medio KB. Los cultivos se mantuvieron en agitación durante 24 h y oscuridad. Al día siguiente fueron observados bajo luz ultravioleta.

#### *2.2.3.5. Producción de proteasas*

La producción de proteasa extracelular se evaluó con la metodología de Kazempour (2004). Los aislamientos bacterianos se estriaron en el centro de una placa con medio de leche descremada agarizado (LDA) (Difco, Argentina) y se incubaron a 28°C, por 24 h en oscuridad. Se observó presencia o ausencia de un halo transparente alrededor de la estría bacteriana debido a la hidrólisis de la caseína del medio. Se realizaron tres ensayos y cada ensayo se repitió tres veces.

#### **2.2.4. Análisis estadístico**

Los datos de los ensayos de metabolitos difusibles y volátiles fueron analizados con el programa R versión 3.1.3 (R. Core TEam 2015). Los modelos lineales convencionales y los contrastes de Dunnett se realizaron con el paquete multcomp de R (Torsten et al. 2008).

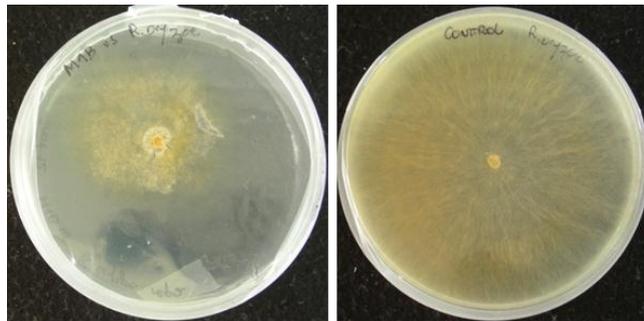
## 2.3. RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados de los mecanismos potenciales de biocontrol de los aislamientos bacterianos, que podrían estar involucrados en la actividad de las mismas sobre los patógenos de MV y PT.

### 2.3.1. Producción de compuestos difusibles

En los ensayos 1 y 2 se registró diámetro de colonia de los patógenos luego de 5 días de incubación. En el ensayo 3, se realizaron también registros a los 2 días de incubación. En primer lugar se realizó un análisis exploratorio de los datos y se observó que los ensayos fueron variables entre sí. Mediante gráficos de residuos se observó que los datos no cumplían con los supuestos para el análisis de la varianza. Por lo tanto, para el análisis de los datos se utilizaron modelos lineales convencionales donde se analizaron los tiempos de incubación por separado para cada patógeno. Para este experimento se presentan los resultados de los análisis a los 2 y 5 días para cada patógeno, tomando a los ensayos como bloques. Las placas que mostraron contaminaciones con hongos o bacterias (n=5) fueron descartadas del análisis.

En general, los cultivos de los patógenos tratados con bacterias mostraron diferencias macroscópicas con respecto a los controles sin tratar. Los primeros presentaron un borde más desparejo, con hifas que se separaban de la superficie del medio y una pigmentación menos intensa de la colonia fúngica, en comparación con la colonia del cultivo control. A modo de ejemplo se presenta en la figura 2.1, el crecimiento del patógeno afectado por los compuestos difusibles de M1B, en placa de Petri.

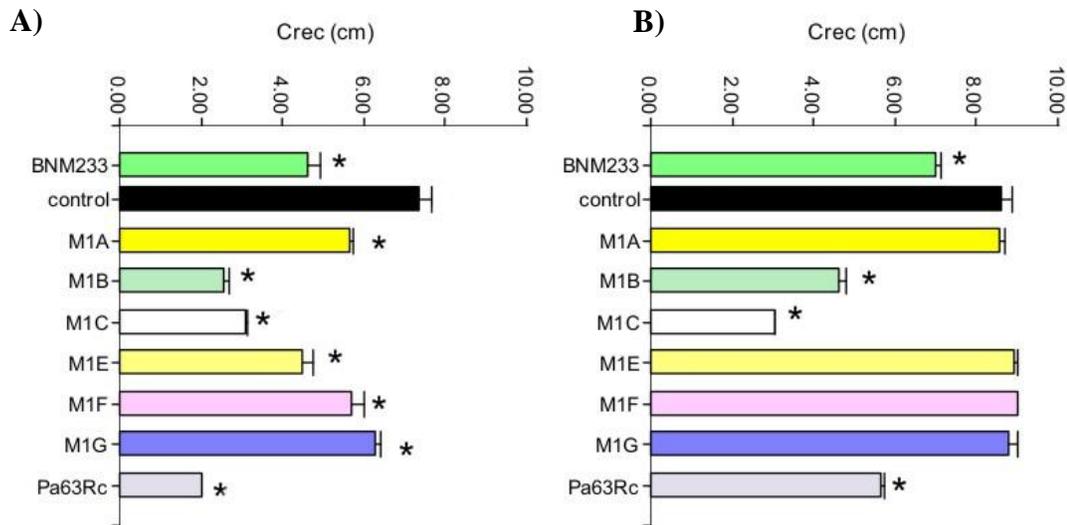


**Figura. 2. 1.** Ejemplo del efecto de los compuestos difusibles sobre el crecimiento de *R. oryzae*.

#### 2.3.1.1. Efecto de compuestos difusibles sobre *R. oryzae*

A los 2 días de incubación todos los aislamientos bacterianos redujeron significativamente el crecimiento de *R. oryzae* con respecto al control. Las mayores diferencias de crecimiento se detectaron para los aislamientos M1B, M1C y Pa63Rc que inhibieron entre 53 y 65%, mientras que M1A, M1E, M1F y M1G y BNM233 inhibieron entre 6 y 18% con respecto al control (Fig. 2.2A).

A los 5 días solamente el aislamiento M1C mantuvo efecto de inhibición sobre *R. oryzae*, (Fig. 2.2B). Los aislamientos M1B, BNM233 y Pa63Rc mostraron un efecto de retardo en el crecimiento micelial con relación al control pero no una inhibición total del crecimiento, comparado con la evaluación anterior. Finalmente, los aislamientos M1A, M1E, M1F y M1G (Fig 2.2B) perdieron la acción inhibitoria sobre *R. oryzae*.



**Figura 2. 2.** Crecimiento promedio en diámetro de colonias (cm) de *R. oryzae*, registrado a los 2 (Fig. A, n= 3) y 5 días (Fig. B, n=9) de exposición a compuestos difusibles de *Pseudomonas* spp. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada aislamiento bacteriano y el control ( $\alpha=0,05$ ).

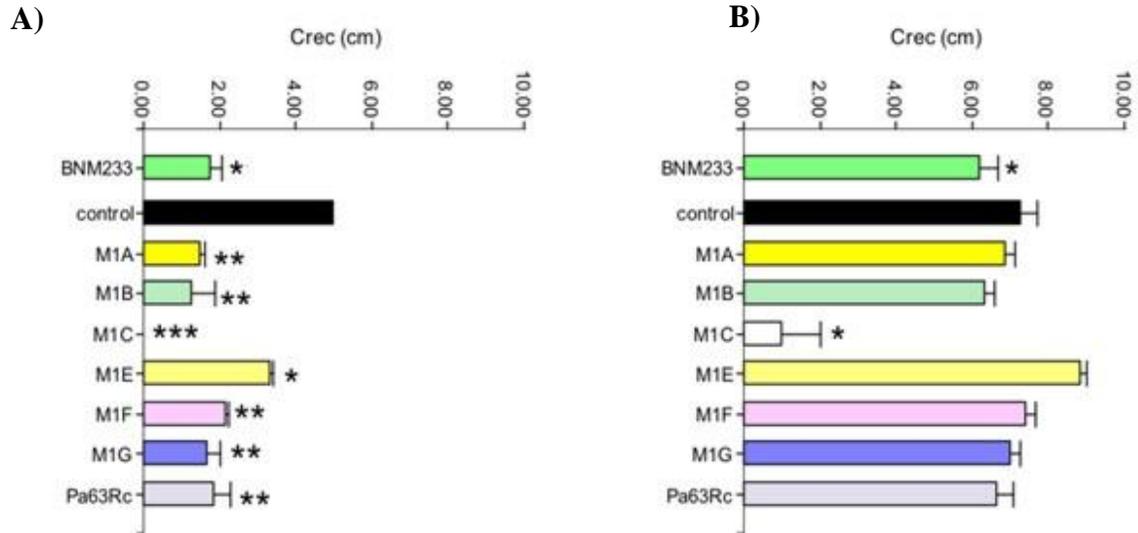
### 2.3.1.2. Efecto de compuestos difusibles sobre *R. solani*

En el caso particular de *R. solani*, solamente el aislamiento M1C redujo a los 2 días (n=3), el crecimiento con respecto al control ( $p= 0,00163$ ), aunque ese efecto no fue observado luego de 5 días de incubación (datos no presentados).

### 2.3.1.3. Efecto de compuestos difusibles sobre *S. oryzae*

El crecimiento de *S. oryzae* también fue afectado por los aislamientos bacterianos (Fig. 2.3). A los 2 días (n=3), todos los aislamientos bacterianos redujeron significativamente el crecimiento. El aislamiento M1C inhibió totalmente el crecimiento de *S. oryzae*, el resto de los aislamientos inhibieron entre el 20 y 40% del crecimiento, a excepción de M1E que mostró un efecto reductor menor (Fig. 2.3.A). Sin embargo, a los 5 días de incubación se observaron diferencias entre los ensayos (n= 6) en que se incluyó este hongo pero mantuvieron la misma tendencia, solamente los aislamientos M1C ( $p=1,14 \times 10^{-12}$ ) y BNM233 ( $p= 0,0029$ ) mostraron un efecto fungistático, afectando el crecimiento de *S.*

*oryzae*, y curiosamente el aislamiento M1E pareció estimular el desarrollo fúngico (Fig. 2.3 B).



**Figura 2.3.** Crecimiento promedio en diámetro de colonias (cm) de *S. oryzae*, registrado a los 2 (Fig. A, n=3) y 5 días (Fig. B, n=6) de exposición a compuestos difusibles de *Pseudomonas* spp. Los asteriscos (\*\*) indican diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) y (\*) diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada aislamiento bacteriano y el control

### 2.3.2. Producción de compuestos volátiles

Se realizó un análisis exploratorio de los datos mediante gráficos y se observó que los resultados de los dos ensayos fueron muy variables entre sí. El crecimiento fúngico también fue muy variable a los 3 y 6 días y las respuestas tendieron a uniformarse al día 9. Además, la mayoría de los aislamientos tuvieron poco o ningún efecto sobre el crecimiento de los hongos, lo que tendía a bajar el efecto global de la variable aislamiento y no se cumplían con los supuestos requeridos para un análisis de varianza.

Por los motivos mencionados anteriormente, se decidió analizar sólo las observaciones del día 9, para cada patógeno por separado, y utilizando el test de Dunnett de comparaciones de tratamientos contra el control (Khuel 2001).

#### 2.3.2.1. Efecto de compuestos volátiles sobre *R. oryzae*

En el cuadro 2.2 se muestran las comparaciones de los diferentes tests de Dunnett para *R. oryzae*.

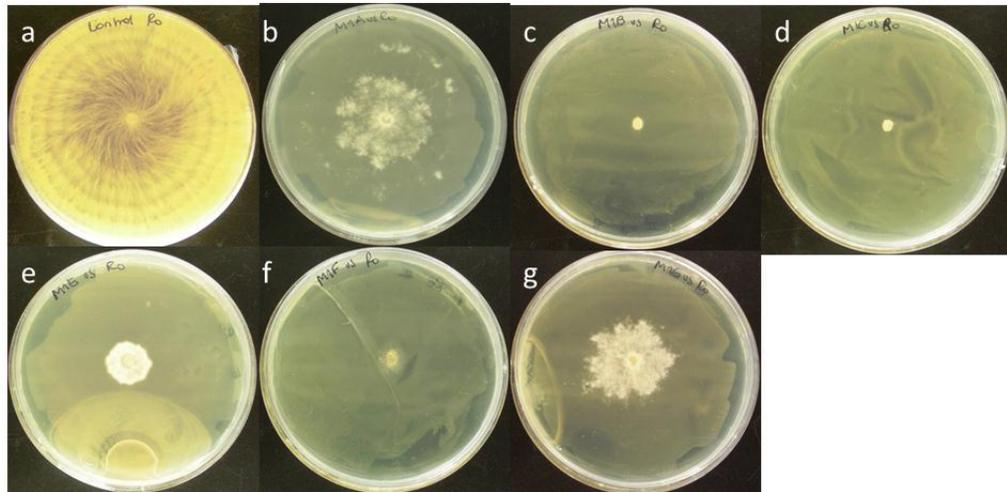
**Cuadro 2.2.** Crecimiento en diámetro de colonias (cm) de *R. oryzae*, registrados luego de 9 días de incubación a 28°C con exposición a metabolitos volátiles.

N° de ensayo	Aislamiento	Crecimiento (cm)	E. E.	Pr(> t )
1	Control	7,37	-----	-----
1	M1A	2,17	1,66	0,03 *
1	M1B	0	1,66	0,002 **
1	M1C	0,57	1,66	0,004 **
1	M1E	1,77	1,66	0,020 *
1	M1F	0,97	1,66	0,007 **
1	M1G	0,40	1,66	0,003 **
1	BNM233	2,70	1,66	0,07
1	Pa63Rc	2,03	1,66	0,04 *
2	Control	8,50	----	-----
2	M1A	7,23	1,58	0,98
2	M1B	6,17	1,58	0,63
2	M1C	4,67	1,58	0,15
2	M1E	7,17	1,58	0,97
2	M1F	5,50	1,58	0,36
2	M1G	4,90	1,58	0,19
2	BNM233	3,60	1,58	0,04 *
2	Pa63Rc	2,40	1,58	0,007**

**Referencias:** Los valores corresponden a las medias del crecimiento (cm) del diámetro del micelio del hongo, el error estándar estimado y el estadístico *t* para la prueba Dunnett. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) y (\*\*) altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre el tratamiento y el control.

En el ensayo 1 todos los aislamientos bacterianos redujeron el crecimiento de *R. oryzae*, a excepción de BNM233. Las diferencias fueron altamente significativas ( $p < 0,01$ ) con M1B, M1C, M1F y M1G mientras que fueron significativas ( $p < 0,05$ ) con M1A, M1E y Pa63Rc. En el ensayo 2, solamente Pa63Rc y BNM233 redujeron significativamente el crecimiento de *R. oryzae*.

Los cultivos de *R. oryzae* expuestos a la acción de los compuestos volátiles de las bacterias, mostraron un crecimiento menos uniforme y con hifas más compactas, casi imperceptibles en algunos casos, con una pigmentación menos intensa (Fig 2.4b-g). En cambio, el micelio del control presentó un color naranja, con un patrón de crecimiento uniforme y adherido al medio de cultivo. Luego de 9 días de incubación el crecimiento del hongo cubrió toda la superficie de la placa (Fig. 2.4 a).



**Figura 2. 4.** Efecto de inhibición del crecimiento de *R. oryzae* por acción de metabolitos volátiles producidos por los aislamientos nativos, correspondiente al ensayo 1. a) control sin bacteria *R. oryzae*; b) M1A; c) M1B; d) M1C; e) M1E; f) M1F; g) M1G.

#### 2.3.2.2. Efecto de compuestos volátiles sobre *R. solani*

En el cuadro 2. 3 se presentan los resultados de los dos ensayos para *R. solani*. En este caso también se observó variabilidad entre los ensayos. En el primer ensayo, ningún aislamiento bacteriano se diferenció del control, mientras que en el segundo ensayo, los aislamientos M1C y Pa63Rc redujeron significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de *R. solani*.

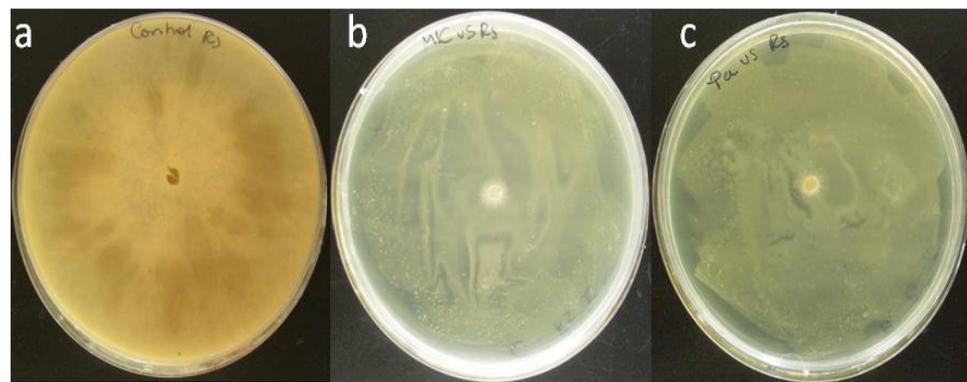
**Cuadro 2. 3.** Crecimiento en diámetro de colonias (cm) de *R. solani*, registrados luego de 9 días de incubación a 28°C con exposición a metabolitos volátiles.

N° de ensayo	Aislamiento	Crecimiento (cm)	E. E.	Pr(> t )
1	Control	7,77	----	----
1	M1A	3,23	3,19	0,670
1	M1B	3,20	3,19	0,662
1	M1C	4,03	3,19	0,833
1	M1E	7,03	3,19	1,000
1	M1F	3,30	3,19	0,684
1	M1G	0,73	3,19	0,219
1	BNM233	3,10	3,19	0,640
1	Pa63Rc	3,17	3,19	0,655

N° de ensayo	Aislamiento	Crecimiento (cm)	E. E.	Pr(> t )
2	Control	8,50	----	----
2	M1A	7,67	2,18	0,99
2	M1B	4,50	2,18	0,39
2	M1C	1,53	2,18	0,03*
2	M1E	3,80	2,18	0,23
2	M1F	3,83	2,18	0,24
2	M1G	8,50	2,18	1
2	BNM233	8,50	2,18	1
2	Pa63Rc	1,03	2,18	0,02*

**Referencias:** Los valores corresponden a las medias del crecimiento (cm) del diámetro del micelio del hongo, el error estándar estimado y el estadístico para la prueba Dunnett. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*) entre el tratamiento y el control.

En la figura 2.5 se muestra, a modo de ejemplo, el efecto de los metabolitos volátiles producidos por M1C y Pa63Rc sobre el crecimiento de *R. solani* en el ensayo 2



**Figura 2.5.** Ejemplo de inhibición del crecimiento de *R. solani* en ausencia o presencia de *Pseudomonas* spp. a) control *R. solani*; b) M1C; c) Pa63Rc.

### 2.3.2.3. Efecto de compuestos volátiles sobre *S. oryzae*

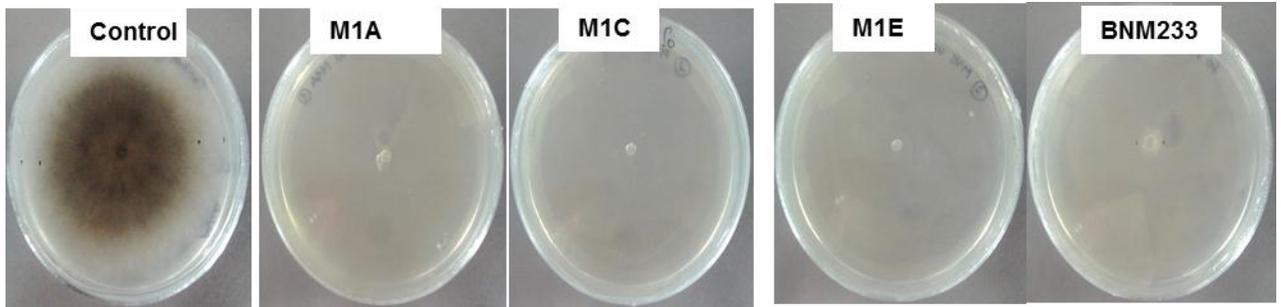
En el caso de *S. oryzae* los resultados también fueron variables entre ensayos. Se observó que el control siempre creció más que los tratamientos con bacterias. Algunos aislamientos redujeron significativamente el diámetro de crecimiento, mientras que otros no demostraron efecto. En el ensayo 1 M1A, M1Cy BNM233 redujeron el diámetro del hongo patógeno, mientras que en el ensayo 2 el efecto de inhibición únicamente se observó con Pa63Rc (Cuadro 2.4.).

**Cuadro 2.4.** Crecimiento en diámetro de colonias (cm) de *S. oryzae*, registrados luego de 9 días de incubación a 28°C con exposición a metabolitos volátiles.

N° de ensayo	Aislamiento	Crecimiento (cm).	E. E	Pr(> t )
1	Control	8,37	----	----
1	M1A	0	2,62	0,03 *
1	M1B	2,83	2,62	0,25
1	M1C	0	2,62	0,03 *
1	M1E	0	2,62	0,03 *
1	M1F	2,83	2,62	0,25
1	M1G	5,67	2,62	0,90
1	BNM233	0,33	2,62	0,04 *
1	Pa63Rc	3,27	2,62	0,33
2	Control	8,33	----	----
2	M1A	6,27	2,40	0,96
2	M1B	5,20	2,40	0,75
2	M1C	2,60	2,40	0,16
2	M1E	6,00	2,40	0,93
2	M1F	5,37	2,40	0,79
2	M1G	3,57	2,40	0,31
2	BNM233	6,30	2,40	0,97
2	Pa63Rc	1,07	2,40	0,04 *

**Referencias:** Los valores corresponden a las medias del crecimiento (cm) del diámetro del micelio del hongo, el error estándar estimado y el estadístico para la prueba Dunnett. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*) entre el tratamiento y el control.

En la figura 2.6 se puede observar el efecto de inhibición de las sustancias volátiles sobre el crecimiento de *S. oryzae* correspondiente al ensayo 1. El micelio del cultivo normal de *S. oryzae* es de color gris oscuro mientras que el micelio que creció en presencia de los compuestos volátiles resultó más claro con menor producción de hifas, casi imperceptible.

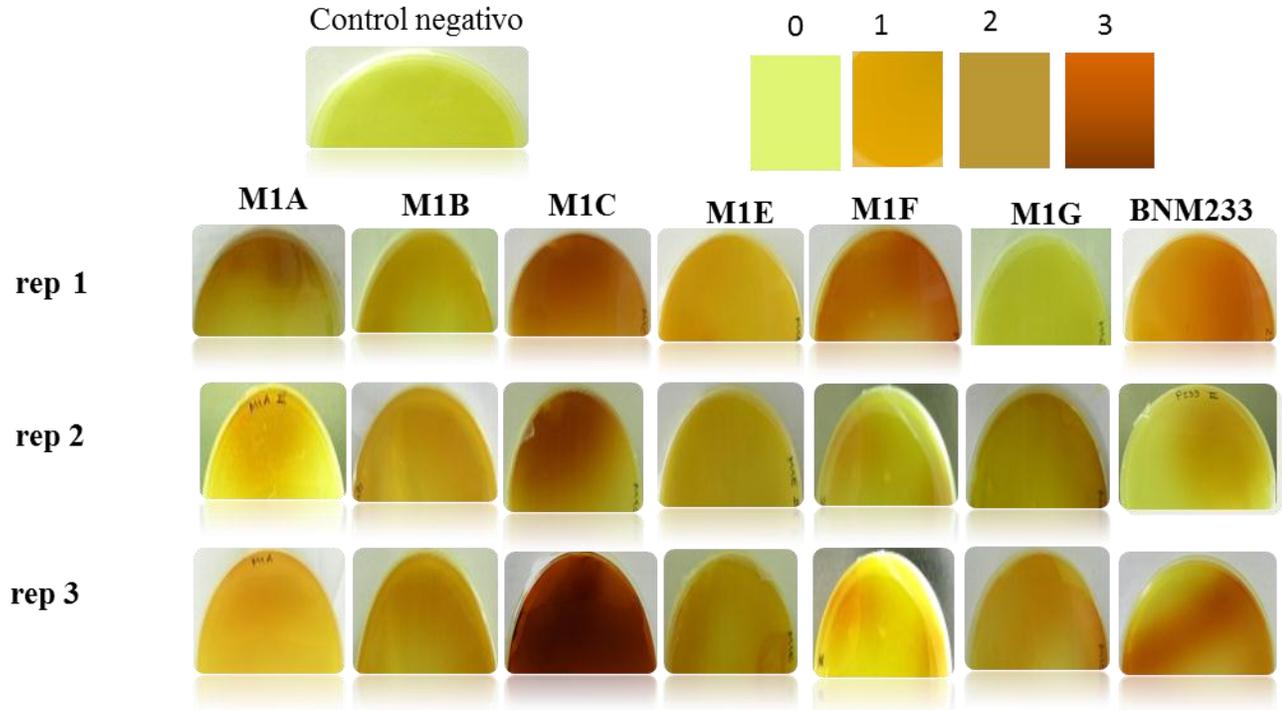


**Figura 2.6.** Ejemplo del efecto de inhibición del crecimiento de *S. oryzae* en ausencia o presencia de *Pseudomonas* spp. correspondientes al ensayo 1. a) control *S. oryzae*; b) M1A; c) M1C; d) M1E y e) BNM233.

### 2.3.3. Determinación de producción de HCN

Se construyó una escala semi-cuantitativa cromática para diferenciar entre aislamientos productores de HCN. La graduación varió, dependiendo de la producción de HCN, desde el color amarillo verdoso (sin producción de HCN), pasando por los rangos naranja (baja producción), marrón (producción intermedia) y marrón rojizo (alta producción de HCN) (Fig. 2.7).

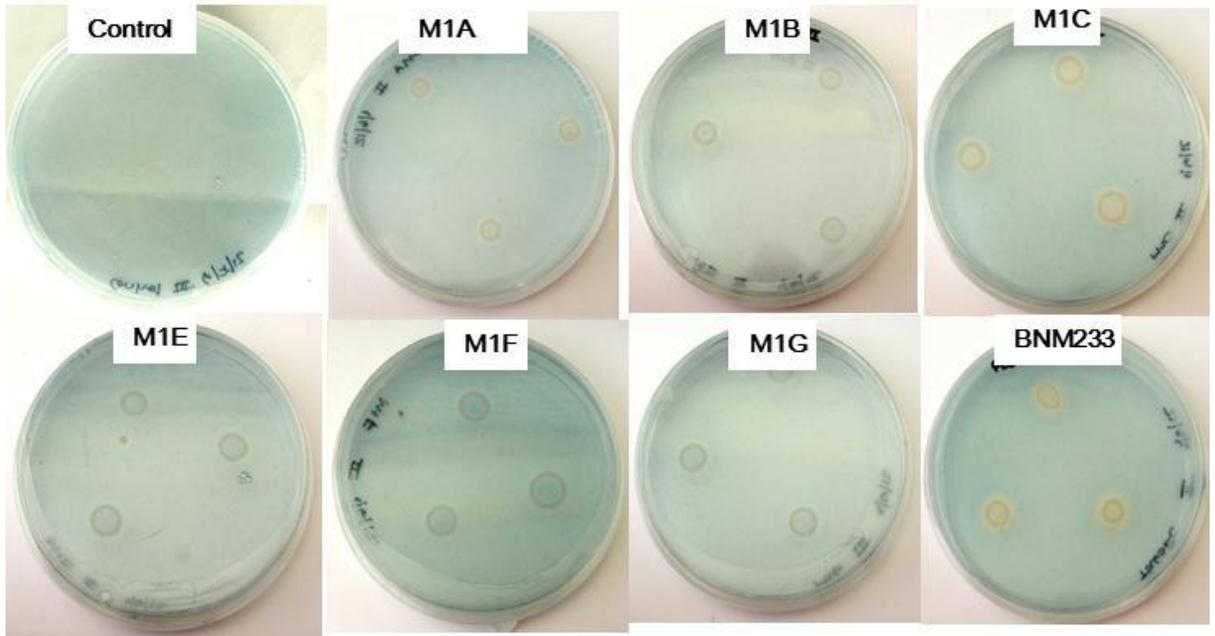
En este experimento se observaron cambios de colores del papel dentro de las 96 h para todos los aislamientos evaluados. En general, todos los aislamientos produjeron cambios de color en el papel indicador en comparación al control negativo aunque se observaron algunas variaciones de intensidad. El mayor cambio se observó en el aislamiento M1C en las tres repeticiones, observándose una coloración marrón rojiza, denotando alta producción de HCN. El resto de los aislamientos mostraron producciones de HCN de bajas a intermedias en todas las repeticiones.



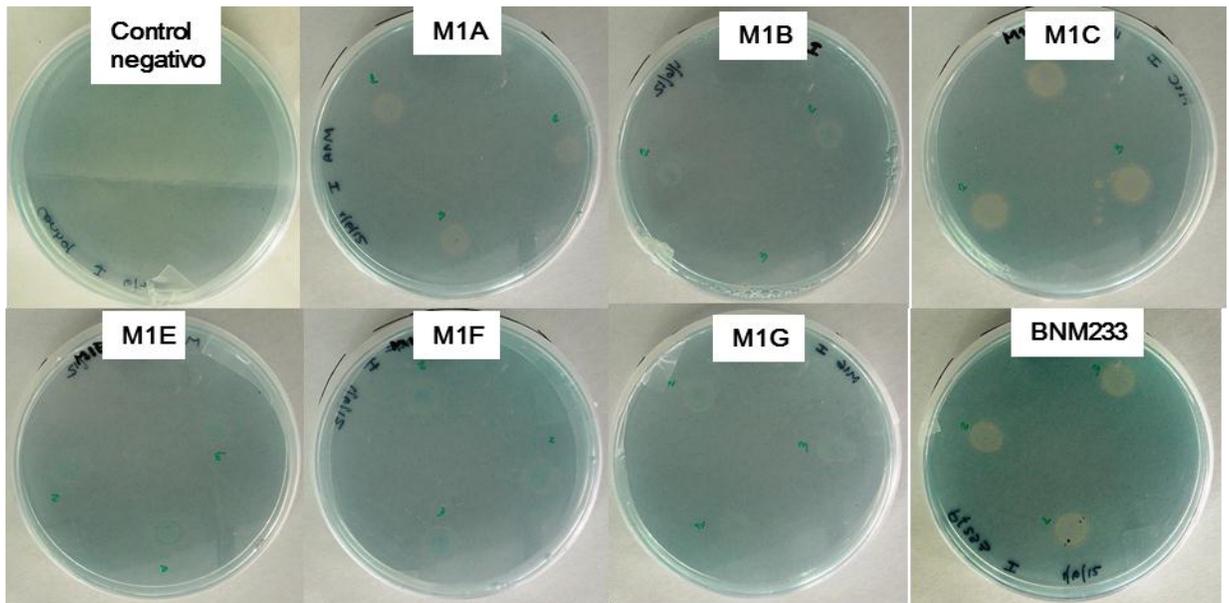
**Figura 2.7.** Producción de HCN en placa de Petri luego de 96 h. Se presentan los resultados obtenidos en las tres repeticiones para los aislamientos bacterianos y el control positivo (BNM233).

#### 2.3.4. Producción de sideróforos

En las figuras 2.8 (a y b) se presentan los resultados de producción de sideróforos en medio agarizado de ambos ensayos. Con esta técnica se detectaron diferencias en el cambio de color producido del medio sin bacteria al medio con inoculación bacteriana (Fig. 2.8) denotando que la bacteria inoculada genera un cambio en los componentes del medio. En general los cambios observados en la coloración no fueron muy notorios sobre el medio para todos los aislamientos. Se puede observar en ambos ensayos que el aislamiento M1C produjo un cambio de azul a naranja más notorio y el comportamiento fue similar al control positivo (BNM233). El aislamiento M1A produjo un halo amarillo claro tenue mientras que en los aislamientos M1B, M1E, M1F y M1G el cambio de color es imperceptible (Fig. 2.8).

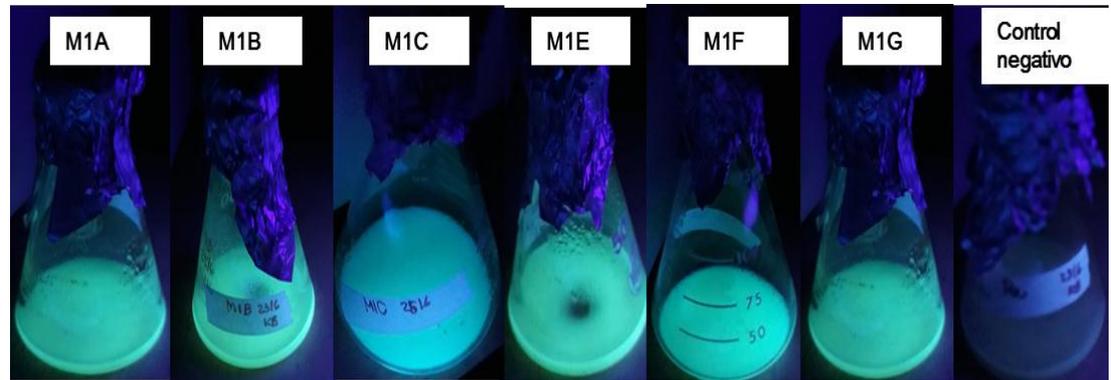


**Figura 2.8a.** Ejemplo del Ensayo 1. Producción de sideróforos por parte de *Pseudomonas* spp. en medio CAS luego de 48 h de incubación a 28°C.



**Figura 2.8b.** Ejemplo del Ensayo 2. Producción de sideróforos por parte de *Pseudomonas* spp. en medio CAS luego de 48 h de incubación a 28°C.

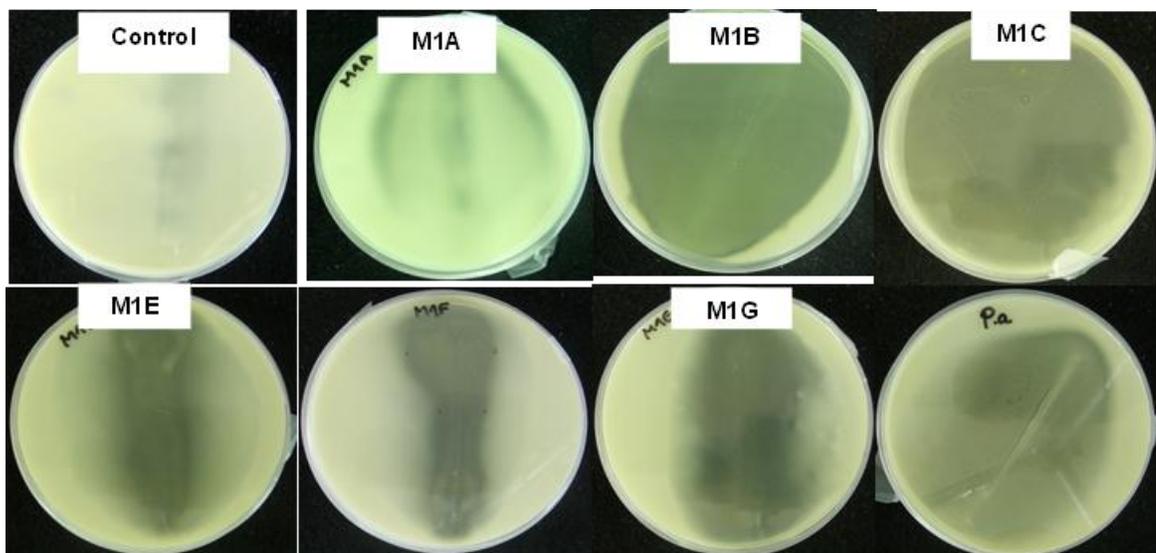
En el medio de cultivo líquido KB todos los aislamientos nativos produjeron un pigmento de color verde amarillento, que se observaron fluorescentes bajo luz ultravioleta. Mediante esta metodología se pudo comprobar que todos ellos producen sideróforos (sideróforo pioverdina). en medio líquido (Fig. 2.9).



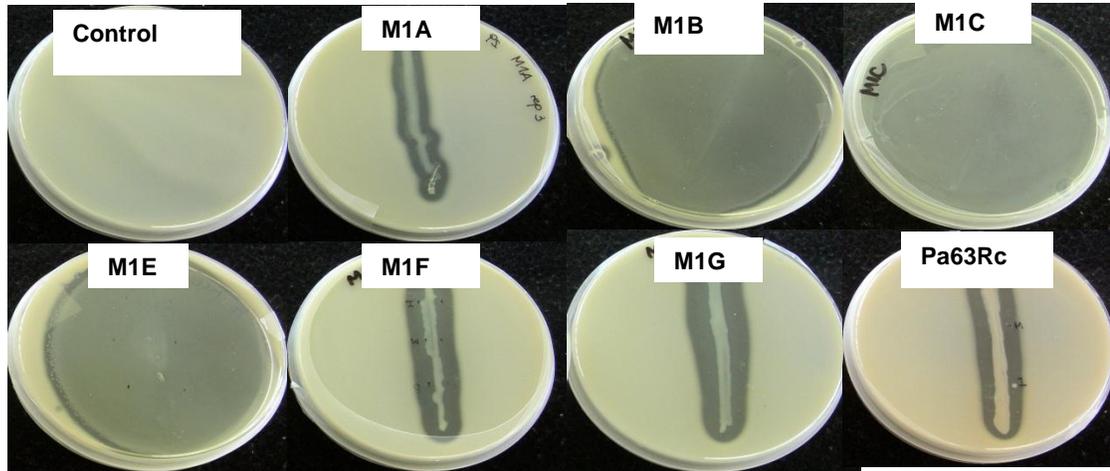
**Figura 2.9** Observación de fluorescencia bajo luz ultravioleta en los aislamientos nativos crecidos en medio líquido KB.

### 2.3.5. Producción de proteasas

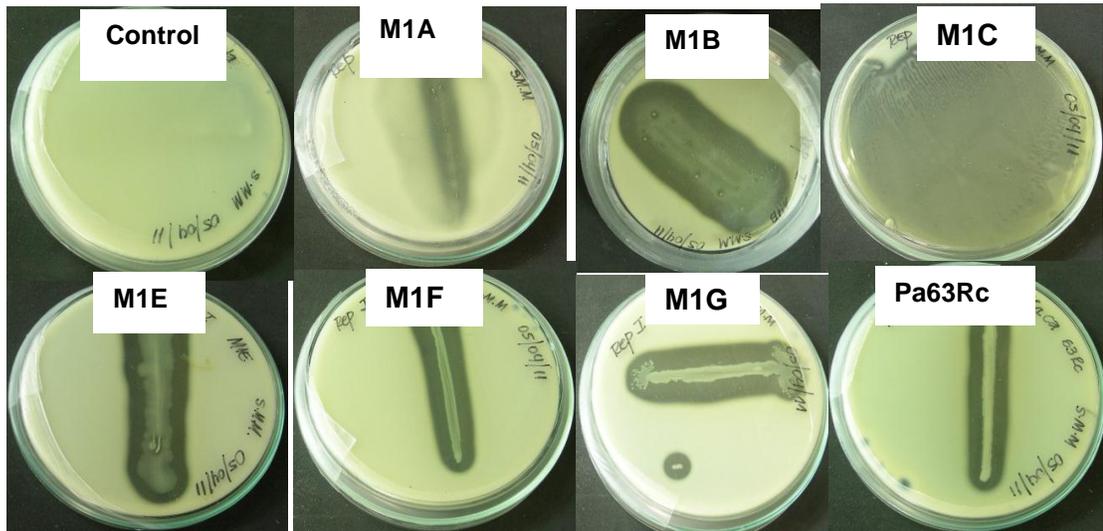
Todos los aislamientos bacterianos produjeron halos de hidrólisis en la caseína. La diferencia entre los aislamientos fue el tamaño del halo producido, un indicador cualitativo de la capacidad de hidrólisis. En las figuras 2.10 (a, b y c) se presentan los resultados de los tres ensayos de proteasas. En los tres ensayos, el aislamiento M1C mantuvo el mismo comportamiento, hidrolizando totalmente la caseína del medio dando una apariencia “transparente”. Los aislamientos M1B, M1E y Pa63Rc tuvieron un comportamiento similar al M1C, pero en el ensayo 3 el halo de hidrólisis fue más pequeño que en los dos ensayos anteriores. Los aislamientos M1A, M1F y M1G manifestaron una menor capacidad de hidrólisis produciendo halos más pequeños o menos notorios en el medio del cultivo.



**Figura 2.10a.** Ensayo 1. Producción de proteasas. Observación de hidrólisis de la caseína por acción de proteasas de los aislamientos bacterianos en medio LDA.



**Figura 2.10b.** Ensayo 2. Producción de proteasas. Observación de hidrólisis de la caseína por acción de proteasas de los aislamientos bacterianos en medio LDA.



**Figura 2.10c.** Ensayo 3. Producción de proteasas. Observación de hidrólisis de la caseína por acción de proteasas de los aislamientos bacterianos en medio LDA.

## 2.4. DISCUSIÓN

Los ACBs pueden utilizar una o varias vías para contrarrestar el crecimiento de los patógenos. La presencia de más de un mecanismo de acción es una característica deseable porque confiere un mayor espectro de control (Gnanamanickam 2002). En nuestro caso, los seis aislamientos bacterianos con antecedentes de biocontrol sobre ETV, poseen más de un mecanismo potencial de acción que podrían intervenir en el control de los patógenos evaluados, confirmando la hipótesis de investigación de este capítulo. La producción de múltiples mecanismos en *Pseudomonas fluorescens* también fue encontrada por Nandakumar et al. (2002), Kazempour (2004), Ayyadurai et al. (2007). Estas características de presentar varios mecanismos son consideradas como ventaja al momento de seleccionar un ACB para la formulación comercial. Sin embargo, los aislamientos nativos demostraron diferente potencialidad. Hubo aislamientos que presentaron actividad para todos los mecanismos estudiados (MIC) y otros que demostraron capacidades para producir sólo algunos de ellos (M1A, M1B, M1E, M1F y M1G). Estas diferencias podrían responder a diferencias genéticas entre los mismos.

Dentro de los mecanismos potenciales de acción, los ACBs exhiben diversidad en cuanto al tipo y número de antibióticos producidos, lo que puede explicar y determinar su potencial para controlar múltiples enfermedades en plantas (Raaijmakers et al. 2002). Diversas cepas de *Pseudomonas fluorescentes* tienen la capacidad de producir antibióticos difusibles o volátiles que inhiben el crecimiento de patógenos en condiciones *in vitro* (Haas y Keel 2003; Weller 2007). El efecto de los compuestos difusibles de los aislamientos nativos sobre los patógenos se pudo corroborar por diferencia de crecimiento en placas de Petri. En una evaluación temprana, todos los aislamientos produjeron efecto de inhibición sobre *R. oryzae* y *S. oryzae*, mientras que solamente la MIC retardó el crecimiento de *R. solani*. En cambio, en evaluaciones más tardías, la MIC mantuvo el efecto sobre *R. oryzae* y *S. oryzae*, pero lo perdió para *R. solani*. Nuestros resultados discrepan con los obtenidos por Kazempour (2004), quien encontró utilizando la misma técnica, en evaluaciones a los 5 días, una reducción de hasta 85% del crecimiento en *R. solani* con una cepa de *P. fluorescens*. Posiblemente los antibióticos difusibles producidos por los aislamientos nativos no sean del mismo tipo que los producidos por esa cepa. Diferencias en el potencial biocontrolador de 45 cepas de *Pseudomonas* sobre *R. solani*, también fueron detectadas por Ayyadurai et al. (2007). Ellos encontraron que de 25 cepas de *Pseudomonas spp* sólo 5 fueron efectivas contra *Magnaphorthe oryzae*, *Sarocladium oryzae* y *R. solani*, mientras que las 20 cepas restantes no afectaron a *R. solani*. Posiblemente, en nuestro caso *R. oryzae* y *S. oryzae* sean más sensibles que *R. solani* a los metabolitos secundarios producidos por los aislamientos analizados.

Los compuestos volátiles producidos por las bacterias pueden interferir en diversos procesos metabólicos de los patógenos. Los compuestos volátiles producidos por los aislamientos nativos no tuvieron efecto sobre *R. solani*. Respecto a este patógeno, nuestros resultados difieren de los de Kazempour (2004), quien detectó reducciones entre 56 y 72% del crecimiento de *R. solani*, con la misma técnica, aunque esa diferencia fue detectada a los 3 días y no a los 9 días como lo realizado en este trabajo. Sin embargo, resultados similares fueron encontrados por Ayyadurai et al. (2007), quienes detectaron control sobre *R. solani*, con sólo una cepa de *fluorescens*, el resto fueron especies de *aeruginosa* o *putida*. Nuevamente, diferencias a nivel de aislamiento en cuanto a metabolitos producidos y la

resistencia/tolerancia del hongo frente a los mismos, podrían explicar, al menos en parte, estas discrepancias. Sobre la base de estos resultados para el control biológico de *R. solani* será necesario continuar con la selección de nuevos aislamientos que demuestren acción antagonica contra ese hongo.

Por otro lado, la metodología utilizada para evaluar la producción y efecto de los compuestos volátiles no fue reproducible en los dos ensayos y los resultados no fueron consistentes. Esas diferencias las atribuimos a fallas en sellado de las cámaras y por ende, a la pérdida de los compuestos volátiles. En trabajos futuros deberá prestarse mucha atención en el ajuste de esta metodología. .

El HCN es un inhibidor potencial de enzimas que participan en procesos metabólicos importantes, incluyendo la respiración (Kremer et al. 2001). En diversas cepas de *P. fluorescens* se ha detectado este compuesto y se lo ha relacionado con su actividad biocontroladora (Ayyadurai et al. 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los seis aislamientos nativos produjeron este compuesto, aunque variaron cualitativamente en las cantidades detectadas. Esto se observó en el cambio de la intensidad de color de los discos impregnados con picrato/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , para cada uno de los aislamientos. Se destacó por coloraciones más intensas el aislamiento MIC. Este comportamiento nos indicaría que podría producir mayor cantidad de HCN, ratificando sus diferencias con el resto de los aislamientos nativos. Resultados similares a los nuestros, con la misma técnica fueron obtenidos por Kremer et al. (2001).

Los sideróforos son metabolitos secundarios producidos durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, que ciertas bacterias producen para atraer a micronutrientes esenciales faltantes, como el caso del hierro. En nuestros experimentos, los resultados fueron diferentes con ambas técnicas. En medio agarizado CAS se detectó un mayor cambio de color desde el azul al naranja en el aislamiento MIC, en relación a los demás aislamientos nativos, y en los aislamientos BNM233 (control positivo) y Pa63Rc (*P. aurantiaca*). ratificando su potencial biocontrolador. La siembra en agar universal de cromo azulol S (CAS) es una técnica ampliamente utilizada para la detección de la producción de sideróforos, por su alta sensibilidad, sin embargo, requiere de muchas precauciones, principalmente con el detergente denominado bromuro de hexadecyltrimetilamonio (HDTMA), siendo esencial en su constitución, pero para algunos microorganismos puede resultar tóxico para hongos y bacterias. Al respecto, Yang et al. (1991) con la misma técnica atribuyeron la variabilidad en la intensidad del cambio de color del medio CAS a la toxicidad del HDTMA en cepas de *Pseudomonas*.

Los medios de cultivos líquidos permiten la recuperación del compuesto una vez concluida la fermentación, debiendo garantizar que su composición contenga bajas concentraciones de hierro (Miranda, 1998). El medio KB es un medio diferencial que permite diferenciar a las especies de *Pseudomonas* del grupo fluorescentes, por ejemplo *P. fluorescens*, de otras especies que no producen el pigmento pioverdina. Este compuesto es secretado como metabolito secundario durante la fase estacionaria de crecimiento (Hernández et al. 1999). En nuestro ensayo todos los aislamientos nativos manifestaron la producción de dichos pigmentos verde amarillentos en medio líquido, fluorescentes bajo luz UV.

La inconsistencia en los resultados de producción de sideróforos en diferentes medios, también fue observada por Alexander y Zuberer (1991). Ellos encontraron que una gran proporción (71-79%) de la población bacteriana que creció en un medio no

selectivo (Agar tripteína de soja) no logró crecer en agar CAS, y varios aislamientos que no mostraron signos de la producción de sideróforos en el medio CAS agarizado, sí produjeron sideróforos en cultivo líquido. En nuestro trabajo, la utilización de dos técnicas distintas nos permitió corroborar la producción de estos quelantes de hierro, haciendo más robustos nuestros resultados con relación a la producción de sideróforos

Las enzimas líticas (proteasas, quitinasas, celulasas) actúan degradando la pared celular del patógeno (Gnanamanickam 2009). La presencia de este mecanismo es importante en los ACBs ya que mediante la inhibición/muerte de los patógenos, los biocontroladores colonizan rápidamente la raíz (Haas y Défago, 2005). La siembra en medio LDA permitió determinar cualitativamente la capacidad proteolítica de los aislamientos nativos. Aplicando esta metodología, todos produjeron proteasas, aunque se pudieron detectar diferencias entre ellos en el tamaño de la zona de hidrólisis. El tamaño de esa zona en el medio podría estar relacionado con la cantidad de proteasa producida por dicho aislamiento (Vermelho et al. 1996), con lo cual, el aislamiento MIC podría destacarse sobre el resto de los nativos. Resultados similares fueron obtenidos por Kazempour (2004) y por Ayyadurai et al. (2007), quienes utilizaron este medio para caracterizar a diferentes cepas de *P. fluorescens*, encontrando diferencias en la capacidad proteolítica de las mismas.

Como conclusión final del capítulo podemos decir que: la caracterización individual de los aislamientos nativos permitió encontrar diferencias entre ellos, en cuanto a la producción de compuestos que podrían ser utilizados en el biocontrol de los hongos causantes de la ETV. Uno de ellos (MIC) demostró marcadas diferencias con respecto a los otros. Dicho aislamiento produjo enzimas, sideróforos y HCN con una aparente mayor actividad y en menor tiempo que las otras y también, demostró que los metabolitos secundarios producidos tienen la capacidad de afectar a los tres patógenos de las ETV, lo cual lo convierte en candidato para futuros estudios de biocontrol. El resto de los aislamientos también produjeron enzimas, sideróforos y HCN pero lo expresaron con menor intensidad, y además se diferenciaron en la producción de antibióticos. Para continuar con la caracterización individual y relacionarla con las diferencias encontradas en los mecanismos de acción, se prosiguió con la caracterización molecular y la identificación de cada uno de ellos a nivel de cepa y especie.

## **CAPÍTULO N° 3**

### **TAXONOMÍA MOLECULAR Y CLÁSICA DE LOS AISLAMIENTOS NATIVOS DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES**

---

### 3.1. INTRODUCCIÓN

La taxonomía convencional bacteriana se basa en estudiar características de un organismo que permitan agruparlo con otros, según sus similitudes. Estas características pueden ser morfológicas, nutricionales, estructurales (por ejemplo estructura química de la pared celular), producción de pigmentos, capacidad para usar diferentes compuestos de carbono, nitrógeno y azufre, sensibilidad a los antibióticos, requerimientos físicos (temperatura, pH, gases), entre otros (Madigan et al. 2000a).

El género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez por Migula en 1894, y su clasificación taxonómica siempre estuvo asociada a técnicas bioquímicas de identificación. Según el manual de Bergey (1989), el género *Pseudomonas* se clasifica sistemáticamente dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pseudomonales*, familia *Pseudomonadaceae*.

Las características mínimas de identificación del género *Pseudomonas* son la forma de bacilos rectos o ligeramente curvados con flagelación polar, Gram negativos, quimioorganotróficos aeróbicos, siempre oxidasa positivo (Madigan et al. 2000b).

Este género se caracteriza por tener requerimientos nutricionales muy sencillos, utilizan una gran variedad de compuestos orgánicos como fuentes de carbono. La temperatura óptima de crecimiento se encuentra en la zona mesófila y el pH óptimo es cercano al neutro (Palleroni 2008). Se encuentra presente en diferentes ambientes (plantas, suelos y agua) y algunos miembros son considerados patógenos de humanos, animales y plantas, mientras que otros miembros saprofiticos pueden causar efecto antagónico sobre fitopatógenos, producir compuestos estimulantes del crecimiento de las plantas, favorecer la simbiosis de otros microorganismos con las plantas y participar en los ciclos del carbono y nitrógeno en la naturaleza (Weller 2007).

El grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes son habitantes comunes de los suelos y miembros predominantes en la rizósfera de muchos cultivos (Tomashow y Weller 1988; Mazzola et al. 1992; Arora et al. 2008; Shanmugam et al. 2008). Además, son consideradas pioneras en colonizar las raíces de las plantas jóvenes por su habilidad para reproducirse rápidamente y aprovechar los exudados radiculares como fuentes de carbono y energía para su multiplicación. A este grupo pertenecen varias especies, entre ellas, *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. aeruginosa* que tienen la capacidad para suprimir a los patógenos de suelo protegiendo semillas y raíces (Bossis et al. 2000). Además de ello, han sido ampliamente estudiadas por su potencialidad como promotoras de crecimiento vegetal, mejorando el desarrollo de plantas e incrementando su rendimiento (O'Sullivan y O'Gara 1992; Dowling y O'Gara 1994).

La especie *P. fluorescens* es muy estudiada como agente de control biológico (ACB) por su facilidad para colonizar raíces, generando una condición adversa para los patógenos del suelo (Couillerot et al. 2009). Algunas de las cepas de esta especie forman microcolonias o biofilms en la superficie radicular, entre las células epidérmicas. Otras cepas tienen la capacidad de colonizar el interior de la raíz, encontrándose en espacios intercelulares de la epidermis y el córtex, siendo también efectivas en la utilización de los exudados radicales para crecer y colonizar agresivamente la rizósfera. Esta facilidad para colonizar raíces, generando una condición adversa para los patógenos del suelo, la convierten en una especie, promisoría como ACB (Couillerot et al. 2009).

Considerando su estudio en el cultivo de arroz, diferentes biovares de *P. fluorescens* han sido aislados desde suelos inundados de arrozceras de India. Estos biovares inhibieron *in vitro* el crecimiento de *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani* y *Sarocladium oryzae* (Vasanth Devi et al. 1989; Ayyadurai et al. 2007, Ramezanpour et al. 2010, Meera y Balabaskar 2012).

### 3.1.1 Taxonomía molecular bacteriana

La clasificación tradicional bacteriana estuvo basada en pruebas bioquímicas y fenotípicas, sin embargo, en los últimos años, la taxonomía molecular ha cobrado muchísima importancia como herramienta de identificación.

La taxonomía molecular se basa principalmente en el análisis de la secuencia completa del gen ribosomal 16S (ADNr 16S). El estudio de los polimorfismos en regiones de este gen es utilizado para analizar diversidad entre géneros y especies. Este gen es altamente conservado, presentando regiones homólogas a todos los procariontes pero también regiones altamente variables, que permiten la clasificación de las bacterias y arqueobacterias a nivel de género y especie (Rodicio y Mendoza 2004). Este método de análisis es uno de los más utilizados en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana.

#### 3.1.1.1. Taxonomía molecular del género *Pseudomonas*

En base a lo anterior, el género *Pseudomonas* fue clasificado filogenéticamente en función de la homología de la secuencia del ADNr 16S por Palleroni et al. (1973) y dividido en cinco grupos. Estos estudios fueron confirmados posteriormente por Moore et al. (1996), Anzai et al. (2000) y Palleroni (2008). Al grupo I, pertenecen las *Pseudomonas* “verdaderas” y es denominado *Pseudomonas sensu stricto*. Es el grupo más grande e incluye tanto a especies fluorescentes (con habilidad para producir el sideróforo fluorescente “pioverdina”) como no fluorescentes. Las especies de *Pseudomonas* de los grupos II a V han sido reclasificadas a nuevos géneros (Palleroni 2008).

Dentro del grupo *Pseudomonas sensu stricto*, las especies fluorescentes más importantes son *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. chlororaphis* y especies patógenas de plantas como *P. syringae* y *P. chichorii*. *P. fluorescens* es una especie heterogénea que puede ser subdividida por diferentes criterios taxonómicos en varios biotipos (Palleroni 2008).

#### 3.1.1.2. Identificación a nivel de especies de *Pseudomonas*

Para la discriminación entre especies, para el grupo de *Pseudomonas sensu stricto* se han diseñado cebadores altamente específicos que amplifican un fragmento de 990 pb del gen 16S ADNr (Widmer et al. 1998). El empleo de estos cebadores específicos y el análisis de restricción del ADN ribosomal previamente amplificado (ARDRA, del inglés Amplified rDNA Restriction Analysis), ha sido exitoso para distinguir entre especies de este grupo aunque algunos aislamientos resultaron difíciles de identificar con el empleo de una sola enzima de restricción. Por ello, Porteous et al. (2002) han generado una técnica muy eficaz para distinguir entre especies del grupo *Pseudomonas sensu stricto* que combina cuatro enzimas que poseen distintos sitios de corte, cuyos fragmentos resultantes son

separados por electroforesis en geles. El patrón de bandas obtenido es comparado y analizado mediante un programa informático para este tipo de datos.

### 3.1.1.3. Identificación a nivel de cepa

Para la identificación a nivel de cepa, la técnica rep-PCR (del inglés, repetitive element sequence-based polymerase chain reaction) ha demostrado ser una poderosa herramienta para estudios de diagnóstico molecular (Ishii y Sadowsky 2009). En esta técnica se utilizan cebadores complementarios que hibridan con secuencias de ADN repetitivas en el genoma, altamente conservadas, presentes en copias múltiples en la gran mayoría de las bacterias Gram negativas y varias Gram positivas (Versalovic et al. 1991; 1994). La técnica de PCR realizada con secuencias de estos elementos repetitivos como cebadores y ADN genómico total como plantilla, genera múltiples amplicones que difieren en tamaño en proporción directa a la distancia genómica entre los sitios de unión de elementos repetitivos adyacentes. Las secuencias de ADN repetitivas más estudiadas son: las secuencias REP (*Repetitive Extragenic Palindromes*, 35-40 pb), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*, 124-127 pb) y los elementos BOX (154 pb) (Louws et al. 1994). Cada cepa o aislamiento microbiano tiene secuencias repetitivas localizadas en distintas regiones de su genoma. Luego de la electroforesis en gel de agarosa, la distribución de los amplicones resueltos genera un patrón de banda único para cada cepa bacteriana y podría ser un indicador de la estructura y evolución del genoma bacteriano (Lupski y Weinstock 1992, Versalovic et al. 1991). Esta técnica permite entonces identificar y diferenciar bacterias a nivel de subespecies o cepas con alto poder de discriminación, en forma rápida y reproducible en una gran variedad de microorganismos (Oda et al. 2002).

### 3.1.2. Caracterización de los aislamientos nativos

Las diferencias en el comportamiento de los aislamientos en las determinaciones de los mecanismos de acción estimularon la identificación individual de cada uno de ellos, a fin de relacionar esas diferencias con diferentes cepas y/o especies. La caracterización molecular complementará la información de cada uno de ellos y será de utilidad para encarar estudios más profundos sobre el control biológico de enfermedades en el cultivo de arroz en Argentina.

En este capítulo se planteó el siguiente objetivo e hipótesis de investigación:

#### **Objetivo del capítulo:**

1. Identificar y clasificar por taxonomía molecular a los seis aislamientos nativos de *Pseudomonas*, caracterizados previamente.

#### **Hipótesis del capítulo**

1. Los seis aislamientos nativos de *Pseudomonas* caracterizados previamente pertenecen a diferentes especies de *Pseudomonas* fluorescentes

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.2. Caracterización genotípica e identificación

La caracterización genotípica de M1 se realizó a nivel de cepa mediante la técnica rep-PCR y a nivel de especie mediante ARDRA. Para cotejar los perfiles de bandas se incluyeron cepas de referencia de tres especies: *P. fluorescens* (Pf-5), *P. aeruginosa* (BNM 292) y *P. putida* (BNM 291).

#### 3.2.2.1 Caracterización a nivel de cepa.

Antes de iniciar la identificación de especies y poder evaluar en forma rápida diferencias entre aislamientos, se realizó una primera caracterización mediante la técnica de rep-PCR con los cebadores BOX, ERIC y REP, siguiendo el protocolo descrito por Versalovic et al. (1991). La extracción de ADN genómico de los aislamientos se realizó con un kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification kit, Promega).

Para las reacciones de amplificación, se resuspendió una colonia crecida en medio AN en agua *milliQ* estéril y se utilizó 1  $\mu$ l de esa suspensión como fuente de ADN genómico. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen total de 25  $\mu$ l conteniendo: buffer Gitschier 1x, 1,25  $\mu$ M de cada cebador, 1,25 mM de cada dNTP, 0,5 U de *Taq* ADN polimerasa, DMSO 10% v/v, glicerol 5% v/v y 5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador automático (MJ Research PTC-100) con un ciclo de desnaturalización inicial de 7 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (90°C, 30 seg), *annealing* (BOX 53°C, 1 min, ERIC 40°C, 1 min; REP 52°C, 1min) y extensión (65°C, 8 min), y una extensión final a 65°C por 16 min. Los productos de reacción (6  $\mu$ l) se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5% (20 x 24 cm), en buffer TBE 1x (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 20 mM, pH 8,3). La electroforesis se realizó a 5 V/cm a temperatura ambiente durante 4,5 h. En un extremo del gel se incluyó un marcador de peso molecular de 1000 pb (1Kb plus DNA Ladder, Invitrogen) como referencia.

Los geles fueron teñidos con el colorante SYBR Safe (Invitrogen) por 30 min y luego se los lavó con agua *milliQ* por otros 30 min. Posteriormente, fueron observados con un transiluminador de luz UV (Spectroline) y fotografiados con el sistema de documentación Kodak EDAS120.

Las imágenes digitales de los perfiles genéticos (*fingerprints*) obtenidos se analizaron con el programa GelComparII (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). El grado de similitud entre los perfiles genéticos se determinó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r). Los dendrogramas se construyeron utilizando el método de pares de grupos con media aritmética (UPGMA, del inglés, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) (Sneath y Sokal 1973; Häne et al. 1993).

#### 3.2.2.2 Identificación de género y especie.

Para la identificación a nivel de género y especie se amplificó por PCR una región de 990 pb del gen 16S ADNr con cebadores específicos para *Pseudomonas sensu stricto*

(Widmer et al. 1998), y el producto de amplificación se analizó por restricción múltiple con las enzimas *AluI*, *Hinfi*, *RsaI* y *MseI* (Porteous et al. 2002). Para la extracción de ADN de los aislamientos bacterianos, se utilizaron tres cepas representativas de los tres perfiles de bandas obtenidos por rep-PCR, como resultado del punto anterior (2.2.2.1). Las especies *P. fluorescens* (Pf- 5), *P. aeruginosa* (BNM292), *P. putida* (BNM291), fueron utilizadas como patrón (Cuadro 2.1). Colonias puras fueron crecidas en caldo nutritivo con glucosa (CNG) e incubadas a 30°C por 24 h, en agitación.

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen de 50 µl conteniendo buffer 1x (provisto con la enzima), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% de DMSO, 0,5 µM de Ps-for (20-mer [59-GGTCTGAGAGGATGATCAGT-39]) y Ps-rev (18-mer [59-TAGCTCCACCTCGCGGC-39]), 0,4 mM de cada dNTP, 0,2 U de Taq ADN polimerasa y 1 µl de ADN genómico. La amplificación incluyó un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), annealing (62°C, 1 min) y extensión (72°C, 2 min) y una extensión final de 72°C por 5 min.

Para la identificación de las especies, los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *AluI*, *Hinfi*, *RsaI* y *MseI*, siguiendo la metodología descrita por Porteous et al. (2002). Las digestiones fueron llevadas a cabo para un volumen final de 100 µl que contenía buffer B 1x (provisto con la enzima), 5 U de las enzimas *AluI*, *Hinfi*, *RsaI*, 10 U de *MseI*, 0,2 mg.µl<sup>-1</sup> de albúmina de suero bovina (BSA) y 40 µl del producto de amplificación. La mezcla fue incubada durante toda la noche a 37°C. El producto de la digestión fue mezclado con colorante SYBR Safe. Posteriormente, se sembraron 50 µl (10 µl + 40 µl de ADN) en gel de agarosa de alta resolución al 4% (agarosa MetaPhor), en *buffer* TBE 1X. La electroforesis se realizó a 5 V/cm por 4 h, incluyendo marcadores moleculares de 50 pb (Promega) en cada extremo del gel. Los geles teñidos con colorante SYBR Safe se observaron con un transiluminador de luz UV y se fotografiaron con el sistema de documentación Kodak EDAS120. Los geles se normalizaron con los marcadores de peso molecular utilizados como referencia y se analizaron con el programa GelComparII (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Los niveles de similitud entre los patrones se calcularon utilizando el coeficiente de similitud Dice (SD) y el análisis de similitud de las matrices se calculó utilizando el método UPGMA (Sneath y Sokal 1973; Häne et al. 1993).

### 3.2.3. Caracterización microbiológica clásica

Además de la caracterización molecular, a cada M1 se le realizó una tipificación mediante tinción de Gram, detección de la enzima citocromo-oxidasa y producción de pigmentos en medio diferencial KB. La tinción de Gram se realizó mediante la metodología de Hucker (Doetsch 1981) para la cual se emplearon cultivos crecidos en medio KB e incubados a 28°C por 24 h. Para la detección de citocromo-oxidasa se utilizó un kit comercial de discos de oxidasa (Britania, Argentina). Los microorganismos que producen la enzima citocromo-oxidasa quedan en evidencia porque en presencia de oxígeno atmosférico y citocromo c, el sustrato presente en los discos se oxida a un compuesto de color rosado-fucsia. Para ello se emplearon cultivos puros sembrados en medio líquido KB e incubados a 28°C por 24 h. Las cepas de referencia utilizadas en esta prueba fueron *P. fluorescens* BNM233 (control positivo) y *E. coli* ATCC 25922 (control negativo) (Cuadro

3.1). La producción de pigmentos fluorescentes se verificó mediante siembra en placas de Petri con medio KB y observación bajo luz ultravioleta luego de 24 h de incubación a 28°C.

### 3.2.4. Caracterización del crecimiento de las cepas nativas en medio de cultivo líquido

Para completar la caracterización de las cepas que resultaron ser genéticamente diferentes por la técnica de rep-PCR (punto 3.2.2.2), se elaboraron curvas de crecimiento y se calcularon sus parámetros de cinética poblacional. Previo a la elaboración de las curvas, las cepas fueron activadas en placas de Petri con medio KB e incubadas a 28°C por 48 h. Luego de ese tiempo, de cada cultivo se tomó una colonia aislada y se sembró en erlenmeyers conteniendo 15 ml de medio líquido KB. Los erlenmeyers se incubaron a 28°C, en agitación durante toda la noche. Al día siguiente dicho cultivo se utilizó como preinóculo para la realización de las curvas de crecimiento de cada cepa.

Para medir el crecimiento microbiano y elaborar las curvas de crecimiento se utilizaron los datos del recuento de células viables en placas ( $\text{ufc ml}^{-1}$ ), obtenidos mediante la técnica de dilución seriada y siembra en KB (Brock 2000). En un erlenmeyer de 1.000 ml se realizó una dilución del preinóculo en 500 ml de medio KB con una concentración inicial determinada. Dicho cultivo fue fraccionado en 10 erlenmeyers de 125 ml que serían utilizados posteriormente para determinar diferentes puntos de la curva del crecimiento bacteriano. Todos los erlenmeyers con sus respectivos testigos (caldo KB sin inóculo) fueron incubados a 28°C en agitación (150 rpm). Los primeros 5 puntos de la curva se registraron cada 30 min, el resto de los puntos fueron medidos cada 60 min. De cada erlenmeyer se realizó una dilución desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$  en tubos con solución fisiológica estéril y se sembraron 100  $\mu\text{l}$  de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  en placas con KB, las cuales se incubaron a 28°C por 24 h. Luego de ese periodo se procedió al recuento de  $\text{ufc ml}^{-1}$  en aquellas placas que tenían entre 30 y 300 colonias. Se realizaron dos repeticiones (placas) por dilución. Posteriormente se calcularon los parámetros de crecimiento para caracterizarlas, según las siguientes fórmulas obtenidas de Brock (2000).

- número de células ( $\text{ufc ml}^{-1}$ )
- velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ,  $\text{h}^{-1}$ ), despejado de:  
 $(\log N - \log N_0) = \mu * 2,303 * (t-t_0)$ ,
- tiempo de duplicación (h)=  $\text{td: } \ln 2 * (0,693/\mu)$ .

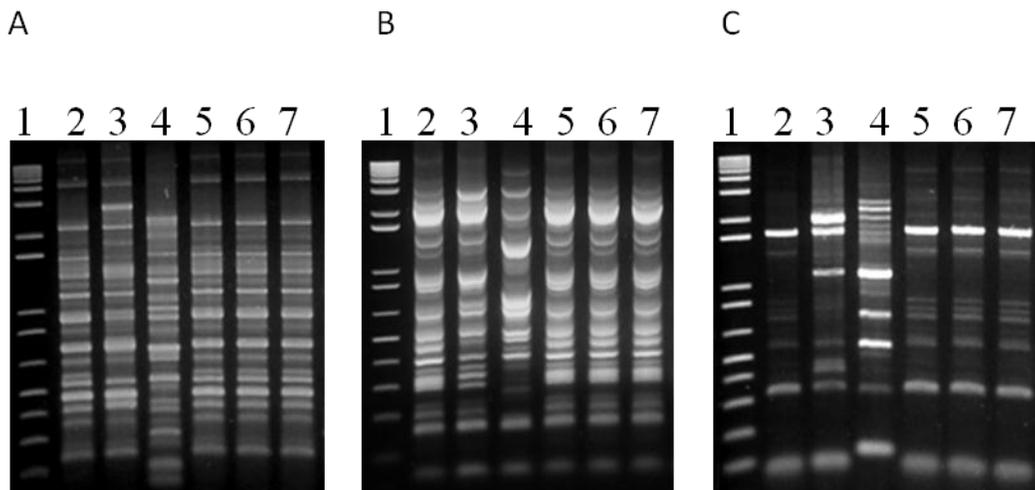
### 3.3. RESULTADOS

En esta sección se presentarán los resultados obtenidos de la caracterización molecular y clásica de los seis aislamientos que demostraron actividad de biocontrol sobre *R. oryzae*, *R. solani* y *S. oryzae* (Pedraza et al. 2008 y 2009). En primera instancia, se realizó una caracterización molecular utilizando la técnica de rep-PCR para determinar la variabilidad genética existente entre las cepas. A continuación, se realizó una amplificación por PCR utilizando cebadores específicos para determinar el género de las mismas. Posteriormente, mediante la técnica ARDRA, utilizando varias enzimas de restricción se determinó la especie a la que pertenecían. Finalmente, se realizó una tipificación mediante técnicas microbiológicas clásicas.

#### 3.3.1. Caracterización molecular e identificación de las cepas bacterianas

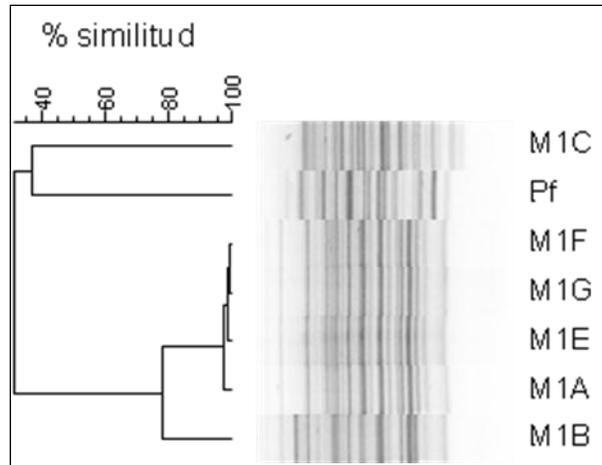
##### 3.3.1.1. Caracterización a nivel de cepa

Los perfiles genéticos obtenidos por BOX-, ERIC- y REP-PCR se observan en la figura 3.1. Los aislamientos M1A, M1B y M1C presentaron *fingerprints* característicos, por lo que pueden considerarse cepas distintas. Los aislamientos M1E, M1F y M1G no pudieron diferenciarse entre sí ni de la cepa M1A, por lo cual se concluye que se trataría de la misma bacteria.



**Figura 3.1.** Perfiles obtenidos por rep-PCR con cebadores BOX (A) ERIC (B) y REP (C). 1: Marcador de peso molecular de 1.000 pb. 2: M1A. 3: M1B. 4: M1C. 5: M1E. 6: M1F. 7: M1G.

El análisis de agrupamiento de los perfiles de BOX-PCR se muestra en la figura 3.2 donde se observa que las cepas M1A, M1E, M1F y M1G están genéticamente más relacionadas entre sí (>95% de similitud) que con las cepa M1B (75% de similitud) y M1C y Pf (34% de similitud).

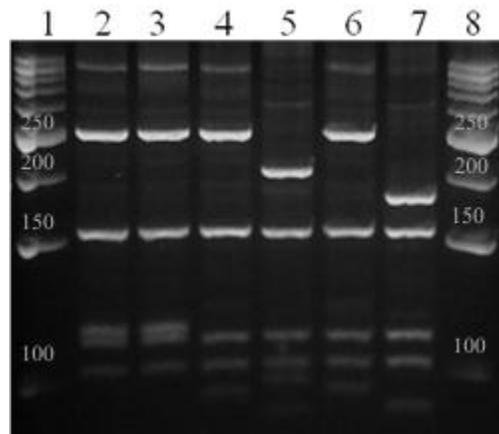


**Figura 3.2.** Dendrograma (Pearson/UPGMA) del análisis de los perfiles genéticos (BOX-PCR) de los aislamientos nativos de arroceras de Entre Ríos.

### 3.3.1.2. Identificación de género y especie

Como en el análisis de agrupamiento las cepas M1A, M1E, M1F y M1G son muy similares entre sí, la identificación a nivel de género/especie se realizó para las cepas M1A, en representación del grupo y para las cepas M1B y M1C, que mostraron ser genéticamente distintas por rep-PCR. Las tres cepas rindieron un producto de amplificación de 990 pb, el cual es del tamaño esperado para los cebadores específicos para el género *Pseudomonas sensu stricto* por lo que las especies obtenidas pertenecerían a dicho grupo.

Finalmente, en el análisis de restricción del fragmento de 990 pb se observó que las bandas más intensas de las tres cepas bacterianas coinciden con el perfil de bandas idéntico al de la cepa tipo de *P. fluorescens*, por lo que pueden clasificarse dentro de esta especie (Fig. 3.3).



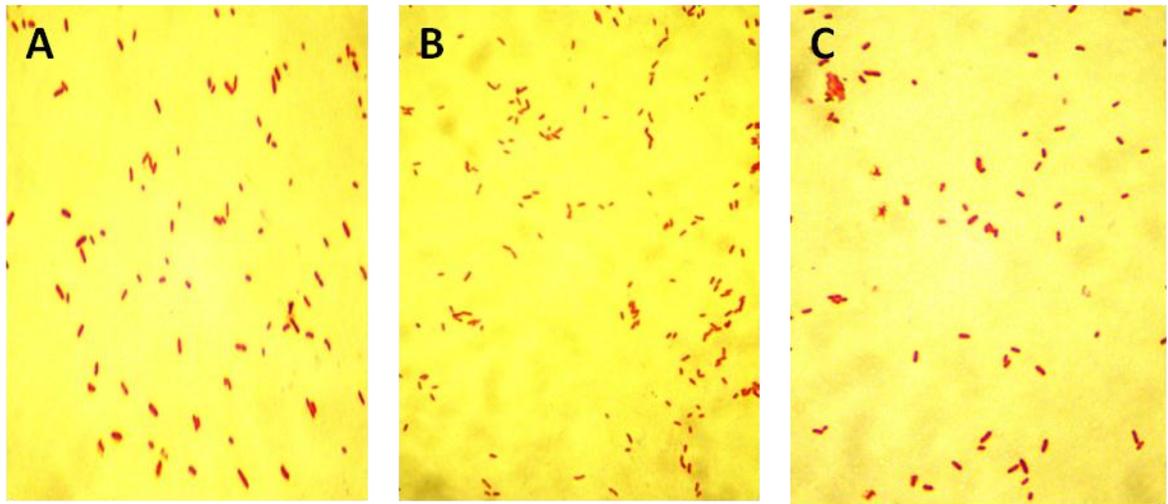
**Figura 3.3.** Resultados de la caracterización por ARDRA con cortes de las enzimas *AluI*, *Hinfl*, *RsaI* y *MseI* 1: Marcador de peso molecular (50 pb). 2: M1A. 3: M1B. 4: M1C. 5: *P. aeruginosa*. 6: *P. fluorescens*. 7: *P. putida*. 8: Marcador de peso molecular (50 pb)

### 3.3.2. Caracterización microbiológica clásica

La tipificación clásica de las cepas se realizó en aquellas que se diferenciaron mediante la técnica de rep-PCR.

#### 3.3.2.1. Tinción de Gram

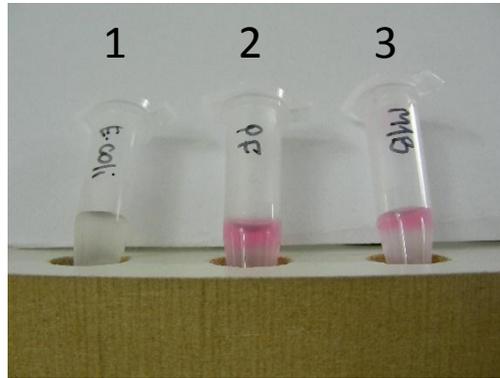
Las tres cepas tipificadas resultaron ser Gram negativas, la morfología celular correspondió a bacilos pequeños, algunos rectos con bordes redondeados y otros levemente curvados, sin agrupamiento entre ellos (Fig. 3.4).



**Figura 3.4.** Observación microscópica (1.000 x) de la tinción de Gram de células de las cepas nativas A). M1A. B). M1B y C). M1C.

#### 3.3.2.2. Detección de actividad de citocromo c-oxidasa

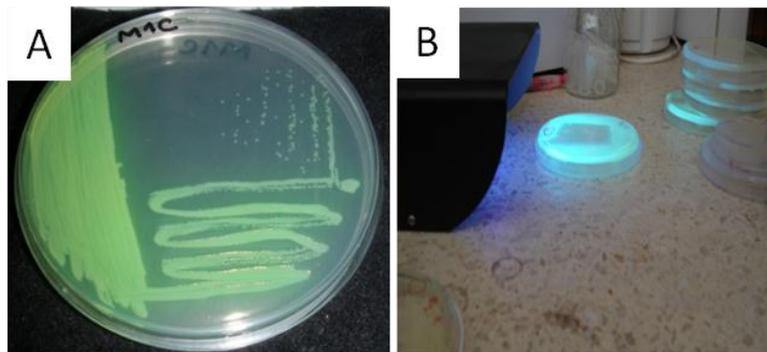
Las tres cepas mostraron reacción positiva para la producción de la enzima citocromo c-oxidasa. Se observó coloración rosado-fucsia pasado un minuto de contacto entre el cultivo bacteriano y el disco conteniendo citocromo-oxidasa, en el control positivo y en las M1, mientras que la cepa del control negativo (*E. coli*) se mantuvo incolora (Fig. 3.5).



**Figura 3.5.** Ejemplo de la actividad de la enzima citocromo c-oxidasa 1) control negativo (*E. coli*). 2) control positivo (*P. fluorescens*). 3) cepa M1B.

### 3.3.2.3. Producción de pigmentos en medio de cultivo diferencial KB

Las tres cepas produjeron pigmentos verde amarillentos en el medio KB (Fig. 3.6.A), los cuales emitieron fluorescencia cuando fueron iluminados con luz ultravioleta (Fig. 3.6.B). Dicha prueba complementa la clasificación de los tres aislamientos dentro del grupo de *Pseudomonas* fluorescentes.



**Figura 3. 6.** Ejemplo de la producción de pigmentos verde amarillentos en medio KB (A). Observación de pigmentos bajo luz ultravioleta (B).

### 3.3.3. Caracterización del crecimiento de las cepas nativas en medio de cultivo líquido

Para las curvas de crecimiento se utilizaron los datos obtenidos del recuento de células viables en medio KB a diferentes tiempos de incubación obtenidas para cada cepa (datos no mostrados). Los parámetros de crecimiento para su caracterización calculados fueron: número de células ( $\text{ufc ml}^{-1}$ ) al comienzo de la etapa de crecimiento estacionario,

velocidad de crecimiento ( $\mu$ ,  $h^{-1}$ ) y tiempo de duplicación (td, h) en la etapa de crecimiento exponencial (Cuadro 3.1).

**Cuadro 3.1.** Parámetros de crecimiento de las cepas nativas de *P. fluorescens* en medio KB. Crecimiento máximo al comienzo de la etapa estacionaria (Log ufc  $ml^{-1}$ ), velocidad específica de crecimiento ( $\mu$   $h^{-1}$ ) y tiempo de duplicación (h) en etapa exponencial. Cada valor representa el promedio de dos repeticiones  $\pm$  su error estándar.

Cepas	Log ufc. $ml^{-1}$	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	td (h)
M1A	8,68 $\pm$ 0,37	0,58 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,05
M1B	8,76 $\pm$ 0,12	0,48 $\pm$ 0,03	1,5 $\pm$ 0,08
M1C	8,84 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,11	1.7 $\pm$ 0,04

Las tres cepas alcanzaron un número máximo similar de células por mililitro al comienzo de la fase estacionaria, la cual se mantuvo en una titulación de  $10^8$ . La velocidad específica de crecimiento fue menor para la cepa M1C con un consecuente tiempo de duplicación mayor, aunque no estadísticamente diferentes al resto ( $p=0,4$ ).

### 3.4. DISCUSIÓN

La elección de los seis aislamientos para su actual caracterización proviene de un *screening* realizado de un total de 144 aislamientos, procedentes de distintas regiones arroceras de Entre Ríos y de Chaco, en trabajos anteriores de este grupo de trabajo. Estos aislamientos fueron seleccionados por su mayor capacidad antagónica frente a patógenos de arroz en cultivos duales y por los niveles de control detectados en aplicaciones a campo frente a PT y MV (Pedraza et al. 2008 y 2009). Los resultados de las pruebas de mecanismos de biocontrol demostraron ciertas diferencias en el comportamiento entre los aislamientos. La caracterización molecular permitió dilucidar si dichas diferencias estaban asociadas a diferencias moleculares.

El análisis a nivel de cepa, por la técnica rep-PCR con tres familias de secuencias repetitivas diferentes es una técnica rápida, sencilla y altamente sensible para detectar diversidad entre los aislamientos (Louws et al. 1994). En nuestro caso dicha técnica permitió encontrar una cierta diversidad a nivel de cepas entre los mismos y establecer que tres de las seis son diferentes entre sí. Además, el análisis de agrupamiento de los perfiles mediante UPGMA determinó que de las seis, cuatro de ellas (M1A, M1E, M1F y M1G) son casi idénticas, con una relación genética cercana a la M1B, encontrándose la M1C más alejada del resto. Estas pequeñas diferencias entre esta última cepa y el resto también fueron observadas en su velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación. La baja diversidad observada entre las cepas podría estar relacionada a su origen. Todas ellas provienen de una misma muestra de suelo, compuesta por sub-muestras, tomadas de diferentes sectores de un lote de arroz, del campo experimental de arroz de la EEA Concepción del Uruguay (Pedraza et al. 2008).

Respecto a la caracterización a nivel de género, las pruebas microbiológicas clásicas de las M1 dieron positivo a la producción de la enzima citocromo c-oxidasa. Esta enzima está presente en bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otros y ausente en las *Enterobacteriaceae*. Lo anterior, sumado a la forma de bacilo y el resultado negativo a la coloración de Gram, permitió, desde lo fenotípico, inferir que todas ellas pertenecen al género *Pseudomonas*. La amplificación de un fragmento del gen 16S ADNr, de 990 pb de los aislamientos con cebadores específicos para *Pseudomonas sensu stricto* (Widmer et al. 1998) confirmó lo observado mediante dichas pruebas. Por otra parte, las cepas nativas produjeron pigmentos de color verde amarillento en un medio diferencial con concentraciones limitantes de hierro, dicha característica identifica al grupo de las *Pseudomonas sensu stricto* (Palleroni 2008). La presencia de *Pseudomonas* fluorescentes en arroceras fue reportada en otros trabajos. Lawongsa et al. (2008) reportaron presencia de *Pseudomonas* fluorescentes en suelos de arroceras en Tailandia, empleando el mismo medio de cultivo y las mismas técnicas para la clasificación taxonómica, determinando que 103 de los 138 aislamientos totales pertenecían a este grupo. En Cuba, Rodríguez-Hernández et al. (2010) aislaron diferentes especies de *Pseudomonas* fluorescentes de suelos de arroceras, con alto potencial de biocontrol para *Pyricularia grisea* y *Curvularia grisea*.

Para una caracterización más específica, el uso de las enzimas *AluI*, *HinfI*, *RsaI*, *MseI*, con corte específico en un fragmento amplificado de 990 pb (Porteous et al. 2002), permite identificar entre varias especies de *Pseudomonas*, entre ellas *P. fluorescens*, *P. aeuroginosa* y *P. putida*, detectando bandas polimórficas características de cada especie: *P.*

*fluorescens* (273-278 pb), *P. aeruginosa* (216-218 pb) y *P. putida* (menor a 200 pb). Nuestros resultados, obtenidos por ARDRA, mostraron que, si bien no son idénticas, las tres cepas nativas evaluadas presentaron el perfil de bandas superiores a los 250 pb, coincidentes con las bandas polimórficas de la especie *P. fluorescens*. Por lo tanto, concluimos que todas las cepas pertenecen a *P. fluorescens* confirmando nuestra hipótesis de investigación. La presencia de *P. fluorescens* en suelos de arrozceras también fue reportada en otros países. Ayyadurai et al. (2007) en India, Reddy et al. (2007) en USA y Ramezani et al. (2010) en Irán, quienes también detectaron que más del 50% del total de las cepas de arrozceras pertenecían a *P. fluorescens* y que, por lo tanto, es la especie más frecuentemente aislada de suelos arrozceros. De la misma manera, Sakthivel y Gnanamickam (1989) sugieren la predominancia de *P. fluorescens* sobre *P. putida* en rizósferas de arroz inundado. Esta podría estar relacionado con lo planteado por Ferreira et al. (2009), quienes aseguran que los exudados radiculares de las especies vegetales presentes, afectan selectivamente el crecimiento de bacterias y hongos que colonizan las rizósferas.

Cepas de la especie *P. fluorescens* son muy estudiadas como ACB por su facilidad para colonizar las raíces y generar condiciones adversas para los patógenos del suelo (Couillerot et al. 2009). Se las ha aislado desde un amplio rango de suelos, bajo diferentes condiciones y a partir de distintos hospedantes (Leeman et al. 1996; Viswanathan y Samiyappan 2002; Rezzonico et al. 2007; Nezarat y Golami 2009; Ramesh et al. 2009) Esta facilidad para colonizar raíces, generando una condición adversa para los patógenos del suelo, la convierten en promisorias como ACB (Couillerot et al. 2009).

## **CAPÍTULO 4**

**EFFECTO DE LAS CEPAS BACTERIANAS SOBRE LA GERMINACIÓN DE LOS ESCLEROCIOS DE *R. oryzae*, *R. solani* y *S. oryzae* Y EFECTO DE LA APLICACIÓN A LAS SEMILLAS.**

---

## 4.1. INTRODUCCIÓN

Las ETV del arroz, causadas por hongos habitantes del suelo son consideradas enfermedades “monocíclicas”, debido a que el patógeno cumple un solo ciclo de infección durante el desarrollo del cultivo (Agrios 2005) Cada año al final de la estación del cultivo, tanto *S. oryzae* como *Rhizoctonia* spp., producen grandes cantidades de esclerocios. Estas estructuras les permiten sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo bajo condiciones desfavorables para el desarrollo de la enfermedad, cumpliendo un importante rol epidemiológico, ya que son la principal fuente de inóculo (Ou 1985; Gunnell 1992).

El principal problema para su manejo se genera en los monocultivos de arroz por varios años (Damicone et al. 1993), o en rotaciones con soja, que es otro hospedante común para el patógeno (Belmar et al. 1987; Spurlock et al. 2016). La aplicación de fungicidas resulta ineficiente para inhibir la germinación (Usmani 1980) y por otro lado, su aplicación al suelo puede afectar la flora microbiana benéfica (Yang et al. 2011).

Por otro lado, las semillas también pueden ser portadoras de microorganismos patógenos y saprófitos que ante condiciones de stress para la semilla como las bajas temperaturas pueden desarrollarse disminuyendo el número final de plántulas. Además de ser fuente de inóculo primario y un eficiente medio de introducción de patógenos a nuevas áreas (Mew y Misra, 1994; Mew y Gonzalez, 2002). Durante los primeros estadios las plántulas de arroz pueden sufrir ataques de patógenos de suelo que producen muerte de plántulas (Ou 1985). La aplicación de ACBs a las semillas persigue dos objetivos: evitar la reproducción de hongos presentes en las semillas, y de hongos que se establezcan en la rizósfera de las plántulas (Catalá et al. 2011). Se ha propuesto a *Pseudomonas* como uno de los géneros bacterianos más abundantes en la rizósfera de muchas plantas de cultivo (Weller 2007; Arora et al. 2008).y como productor de diferentes compuestos antifúngicos que con capacidad para controlar el desarrollo de hongos fitopatógenos.

Por lo anterior, en este capítulo se evaluó el efecto las cepas de *P. fluorescens* sobre la germinación de los esclerocios de *R. oryzae*, *R. solani* y *S. oryzae* y el efecto de su aplicación sobre las semillas para contrarrestar el posible desarrollo fúngico. Los resultados de estos ensayos permitirán inferir sobre la posibilidad de utilizar a las cepas para disminuir el inóculo inicial de las ETV en el suelo y/o en tratamientos de semillas.

### Objetivos del capítulo.

1. Determinar el efecto de las cepas bacterianas sobre la germinación de esclerocios de *R. oryzae*, *R. solani* y *S. oryzae*.
2. Evaluar el efecto de las cepas bacterianas sobre el desarrollo fúngico en semillas durante exposición a bajas temperaturas.

### Hipótesis del capítulo

1. Los aislamientos bacterianos afectarán la germinación de los esclerocios de *R. oryzae*, *R. solani* o *S. oryzae*.
2. La aplicación de algunas de las cepas bacterianas afectará el desarrollo de hongos presentes en las semillas.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Efecto sobre la germinación de los esclerocios**

#### *4.2.1.1. Producción de esclerocios de los patógenos*

Los esclerocios de los tres patógenos se produjeron en condiciones de laboratorio. Para ello, un disco de 5 mm de cada cultivo de los patógenos activados fue sembrado en el centro de las placas con APG. Las placas se incubaron a 28°C, por siete días y luz continua, sin sellar. Los esclerocios obtenidos fueron cosechados por raspado de las placas.

Previo al ensayo los esclerocios se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 2%, durante 2 minutos, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y se secaron sobre toalla de papel estéril. Finalmente fueron recolectados en una placa estéril conformando un pool de esclerocios.

#### *4.2.1.2. Cepas bacterianas*

Se utilizaron las cepas M1A, M1B y M1C, representantes de cada cepa caracterizadas previamente en el capítulo 3 (apartado 3.3.1.1). La activación de las mismas y la preparación del pre-inóculo se realizaron con la misma metodología que en punto 2.2.1.1 del capítulo 2.

#### *4.2.1.3. Producción del inóculo bacteriano para el tratamiento de esclerocios*

Se sembró un ml del inóculo, previamente activado en 100 ml del medio líquido KB. Los erlenmeyers se incubaron a 28°C, por 24 h y agitación (150 rpm, Multi PSU-20). Luego de ese tiempo, se colocaron aproximadamente 80 esclerocios de cada patógeno en erlenmeyers conteniendo los 100 ml del cultivo de cada suspensión bacteriana. Como control se colocaron esclerocios en erlenmeyers con medio líquido KB. Cada erlenmeyer fue incubado a 28°C por 72 h en agitación (150 rpm), y en oscuridad. Cumplido ese paso, los esclerocios se filtraron a través de un embudo con papel de filtro estéril (Whatman N° 1) y se escurrieron sobre toalla de papel estéril. De ellos, diez esclerocios se sembraron en placas con medio APG con antibióticos (Ampicilina, 25 mgL<sup>-1</sup>, Tetraciclina, 100 mgL<sup>-1</sup> y Rifampicina, 50 mgL<sup>-1</sup>) (Sigma, Argentina) y se incubaron a 28°C, por cuatro días y luz continua. Se realizaron cinco placas para cada cultivo bacteriano. A las 96 h se registró el número de esclerocios germinados y se calculó el porcentaje de germinación de esclerocios (%GE).

### **4.2.2. Efecto de la aplicación de *P. fluorescens* sobre el desarrollo de hongos en semillas de arroz**

#### *4.2.2.1. Material Vegetal*

Se utilizaron semillas de Don Juan cosechadas en la campaña 2013/2014. El cultivar Don Juan INTA es un cultivar de rendimiento medio (7000 kg/ha), cuyas

plántulas poseen un comportamiento tolerante a las bajas temperaturas (Benavidez 2006). Previo al ensayo las semillas fueron expuestas por 7 días a 55°C para romper la dormición. Posteriormente fueron desinfectadas con etanol 70% durante 1 minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 10% durante 20 min, tres enjuagues con agua destilada estéril y escurridas sobre papel de filtro estéril.

#### 4.2.2.2. *Inóculo bacteriano*

Se sembró 1 ml de cultivo en erlenmeyers de 250 ml conteniendo 100 ml de medio líquido KB. Los erlenmeyers se incubaron a 28° C, por 24 h, en oscuridad y en agitación a 150 rpm en un agitador orbital (Multi PSU-20). Concluido este paso se determinó la concentración de ufc ml<sup>-1</sup> para cada cultivo, por dilución y recuento en placa.

#### 4.2.2.3. *Tratamiento de las semillas*

Dos gramos de semillas previamente desinfectadas se sumergieron en erlenmeyers de 250 ml conteniendo 100 ml de la suspensión bacteriana de 24 h y se incubaron a 28°C por 24 h, en agitación (150 rpm). Transcurrido ese tiempo, las semillas fueron filtradas a través de discos de filtro estériles y escurridas sobre papel toalla estéril bajo flujo laminar. Semillas incubadas en agua destilada estéril fueron utilizadas como control. Posteriormente, se sembraron 25 semillas tratadas con las bacterias por cada placa de Petri con doble hoja de papel absorbente (SyS) y 4 ml de agua destilada estéril. Las placas fueron incubadas a 16°C en oscuridad en cámara de crecimiento (E-36HO, Percival, USA) por 14 días. Durante este periodo, se registró el número de semillas germinadas y se calculó el porcentaje de germinación. A partir de los 14 días, las semillas fueron expuestas a la misma temperatura pero bajo fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad. Cumplidos 28 días del ensayo, se registró el número de semillas con presencia de micelio (estructura fúngica) y se calculó el porcentaje de semillas con desarrollo fúngico. Los tratamientos fueron 5 cepas (M1A, M1B, M1C, BNM233, Pa63Rc) y el control sin tratar. Se sembraron seis placas por tratamiento con 25 semillas por placa.

### **Análisis estadístico**

Los datos de %GE y %DF fueron transformados por la función arcoseno raíz cuadrada. Los datos no cumplieron con los supuestos para un análisis de varianza por lo que se utilizó un test no paramétrico de Kruskal Wallis Los datos se analizaron con el programa INFOSTAST (Di Rienzo et al. 2014).

## 4.3. RESULTADOS

### 4.3.1. Efecto sobre la germinación de los esclerocios

#### 4.3.1.1 Germinación de los esclerocios de *R. oryzae*

Todos los tratamientos bacterianos redujeron significativamente la germinación de los esclerocios de *R. oryzae* (Cuadro 4.1). Las cepas M1A, M1B y Pa63Rc inhibieron totalmente la germinación de los esclerocios, mientras que la cepa M1C redujo el 80 % de la misma.

**Cuadro 4. 1.** Porcentaje de la germinación de esclerocios de *R. oryzae* luego de ser incubados durante 72 h en suspensiones bacterianas de *P. fluorescens*.

Variable	Cepas	Medias	D.E.	H	p
%GE	Control	90	0	23,15	<0,0001
	M1A	0*	0		
	M1B	0*	0		
	M1C	20*	10		
	Pa63Rc	0*	0		

**Referencias:** Los valores son promedios de 5 repeticiones. Los valores marcados con \* difirieron significativamente del tratamiento control, de acuerdo a Kruskal wallis ( $p \leq 0,05$ )

#### 4.3.1.2. Germinación de esclerocios de *R. solani*

Los tratamientos con las cepas bacterianas no mostraron capacidad de inhibir la germinación de los esclerocios de *R. solani*. Al momento de la evaluación (96 h de incubación), el micelio generado a partir de los esclerocios ocupó por completo la superficie de las placas (datos no presentados).

#### 4.3.1.3 Germinación de esclerocios de *S. oryzae*

La germinación de los esclerocios de *S. oryzae* también se vio afectada significativamente por las cepas bacterianas. Sin embargo, solamente la cepa M1C y Pa63Rc redujeron significativamente la germinación con respecto al control (cuadro 4. 2).

**Cuadro 4. 2.** Porcentaje de la germinación de esclerocios de *S. oryzae* luego de ser incubados durante 72 h en suspensiones bacterianas de *P. fluorescens*.

Variable	Cepas	Medias	D.E.	H	p
%GE	Control	90	0	15,32	0,0036
	M1A	80	0		
	M1B	74	0		
	M1C	36*	10		
	Pa63Rc	62*	0		

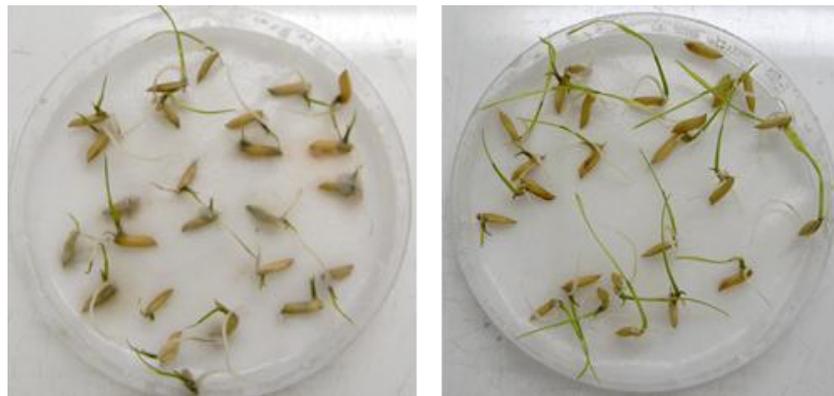
**Referencias:** Los valores son promedios de 5 repeticiones. Los valores marcados con \* difirieron significativamente del tratamiento control, de acuerdo a Kruskal wallis ( $p \leq 0,05$ )

#### 4.3.2. Efecto de la aplicación de *P. fluorescens* sobre el desarrollo de hongos en semillas de arroz

Los títulos de los cultivos bacterianos de las cepas M1A, M1B, M1C, BNM233 y Pa63Rc empleados en la presente experiencia fueron  $2,16 \times 10^7$ ,  $1,51 \times 10^7$ ,  $3,72 \times 10^7$ ,  $1,54 \times 10^7$  y  $4,97 \times 10^7$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ , respectivamente.

En general se observó que la germinación durante los primeros días del ensayo fue uniforme (datos no mostrados) y sin diferencias entre los tratamientos ( $p = 0,37$ ). Sin embargo, pasado el tiempo de exposición a temperaturas bajas se observó que las semillas tratadas con bacterias germinaron casi sin desarrollo fúngico sobre su superficie, en comparación a las no tratadas (Fig. 4.1), mostrando un efecto antifúngico de aquellas.

En este ensayo se observó presencia de estructuras del hongo (micelio) sobre semillas germinadas aunque los géneros fúngicos no fueron identificados en medio de cultivo. El tratamiento con *P. fluorescens* disminuyó la proliferación de hongos sobre las semillas germinadas en cambio en el control las semillas mostraron mayor desarrollo fúngico. Algunas germinaron y murieron o bien no llegaron a desarrollar normalmente sus estructuras.



**Figura 4.1.** Presencia de hongos sobre semillas de Don Juan. A) semillas sin tratar. B) semillas tratadas con bacterias.

Los datos de porcentajes de desarrollo fúngico fueron transformados y sus residuos graficados para la comprobación de los supuestos. Dado que los mismos no

cumplían los supuestos para un análisis de varianza se decidió analizarlo mediante el test no paramétrico de Kruskal Wallis. El tratamiento con bacterias redujo significativamente ( $p < 0,0001$ ) el desarrollo de hongos sobre las semillas. Los porcentajes de desarrollo fúngico variaron entre 0 y 5% para las semillas tratadas con las bacterias y fue 71% en el control sin tratar (Cuadro 4.3).

**Cuadro 4.3.** Porcentaje de semillas con desarrollo fúngico (%DF), previamente tratadas con *Pseudomonas* e incubadas por 28 días a 16°C. Se evaluaron cinco cepas (M1A, M1B, M1C, BNM233 y Pa63Rc) y un control sin tratar. Se presentan las medias, el desvío estándar, el estadístico *H* y el valor de la significancia (*p*)

Cepa	% DF	D.E	valor <i>H</i>	<i>p</i>
Control	71	30,82	15	0,0001
M1A	0*	0		
M1B	3*	6,53		
M1C	0*	0		
BNM233	5*	6,53		
Pa63Rc	3*	11,43		

**Referencias:** Los valores son promedios de 6 repeticiones. Los valores dentro de la columna %DF marcados con \* solamente difirieron significativamente del tratamiento control, de acuerdo a Kruskal wallis ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4. DISCUSIÓN

Los esclerocios que persisten en el suelo son la principal fuente de inóculo de los patógenos causantes de las ETV (Ou 1985; Gunnell 1992) y además, actúan como estructuras de resistencia de los hongos ante condiciones adversas (Gunnell 1992). Tanto la incidencia como la severidad de las ETV están positivamente correlacionadas con el número de esclerocios presentes en la capa superior del suelo (Webster et al. 1972; Krause y Webster 1973; Webster 1974; Rush 1992). Esto genera la necesidad de un mejor manejo de estas estructuras. Los resultados de este capítulo demuestran que las cepas nativas de *P. fluorescens* tienen la capacidad de reducir la germinación de los esclerocios de *R. oryzae*; parcialmente la germinación de *S. oryzae* y no afectan la germinación de los esclerocios de *R. solani*, con lo cual la primera hipótesis planteada en este capítulo se acepta parcialmente. El efecto antifúngico dependió de la cepa bacteriana y del patógeno en cuestión. La cepa MIC fue la única que mostró efecto de control sobre los esclerocios de *R. oryzae* y *S. oryzae*, reduciendo la germinación en 80 y 40%, respectivamente. El resto de las cepas solamente lograron altos porcentajes de inhibición de los esclerocios de *R. oryzae*. Estos resultados son consistentes con las diferencias moleculares y de mecanismos de acción evaluados en capítulos anteriores de este trabajo.

A su vez, nuestros resultados remarcan las diferencias de sensibilidad de los patógenos de las ETV frente a las cepas bacterianas estudiadas. Los esclerocios de *R. oryzae* fueron los más sensibles a la acción bacteriana, llegando a inhibirse en un 100% su germinación con algunas cepas. En cambio, los esclerocios de *R. solani* no fueron afectados por ningunas de las cepas bacterianas. Posiblemente nuestra cepa de *R. solani* utilizada para estas pruebas sea más resistente y/o la capacidad inhibitoria de las *P. fluorescens* nativas sea menor a la de otras bacterias. Esta variabilidad en la respuesta frente a un antagonista entre especies diferentes de *Rhizoctonia* patógenos de arroz también fue encontrada por Ruiz et al. (2013). Es probable además, que las diferencias de tamaño de los esclerocios entre ambas especies de *Rhizoctonia*, expliquen en parte, la mayor sensibilidad de los esclerocios de *R. oryzae* a la acción antifúngica de las cepas nativas. Si bien el tiempo de contacto entre la cepa bacteriana y el hongo fue el mismo, los esclerocios más chicos, al tener una mayor superficie en relación al volumen, pudieron tener un mayor contacto superficial con el cultivo bacteriano. La importancia del tamaño de los esclerocios como factor que influencia la efectividad de los antagonistas, también fue destacada por otros autores (Papavizas y Collins 1990; Lewis y Fravel 1996).

La baja efectividad de las cepas nativas sobre *R. solani* se reflejó también en los resultados del capítulo 2, donde el micelio tampoco fue afectado por los antibióticos producidos por las cepas bacterianas. Nuestros resultados sobre *R. solani* no son coincidentes con otros trabajos, donde cepas de *P. fluorescens* o *Bacillus subtilis* lograron inhibir *in vitro* en forma parcial o totalmente la germinación de los esclerocios de *R. solani* (Vasanth Devi et al. 1989; Nandakumar et al. 2002; Kazempour 2004; Kotamraju 2010). En relación a los esclerocios de *S. oryzae* se observó un efecto fungistático, con una reducción parcial de la germinación de los mismos. La acción fungistática por microorganismos del suelo sobre los esclerocios de *S. oryzae* también fue observada por otros autores (Keim y Webster 1975). Ellos detectaron disminuciones de la germinación de los esclerocios con microorganismos del suelo productores de compuestos inhibidores. Al respecto, Krishnamurthy y Gnanamanickam (1998) señalan a la fungistasis como una manera de controlar a los

patógenos, impidiendo que éstos lleguen a su máximo desarrollo. Reducciones similares (23-34%) sobre este patógeno fueron logradas con otros antagonistas bacterianos. (Rosales et al. 1993), o fúngicos (Usmani 1980; Garrido Rondoy 2009; Ruiz et al. 2013; Venkateswarlu et al. 2015).

En las fechas de siembra comunes para el cultivo de arroz en la zona de Entre Ríos y Corrientes la temperatura de la cama de siembra es cercana a los 16°C (Malagrina 2008), con lo cual la germinación y la emergencia se retrasan, exponiendo a la semilla al ataque de patógenos. Sobre la base de estas premisas, en nuestro trabajo, la exposición a bajas temperaturas favoreció marcadamente el desarrollo de hongos sobre las semillas sin tratar y en muy bajo porcentaje sobre las semillas tratadas, permitiendo disminuir el número final de semillas muertas o con desarrollo fúngico. Este resultado confirma la segunda hipótesis planteada en el capítulo. Esto indicaría que las cepas bacterianas estarían ejerciendo un efecto antifúngico sobre hongos que afectan a semillas de arroz en condiciones de bajas temperaturas y podrían servir de “protectores” en aplicaciones a las semillas para favorecer que las mismas se desarrollen normalmente. Resultados similares a los nuestros fueron reportados por Gnanamanickam (2009). La bacterización de semillas de arroz con antagonistas, lograron reducir entre 72 y 96% la incidencia de *Fusarium fujikuroi*. Del mismo modo, la bacterización de las semillas con *Pseudomonas* protegieron a las plantas de la infección de *R. solani* (Mew y Rosales 1986). En otro estudio, *Bacillus* sp. protegió a las semillas de la infección de *R. solani* de los suelos y permitió indirectamente incrementos de germinación y longitudes de raíz y hoja (Kumar et al. 2011). En nuestro caso, el efecto de control de dichas cepas podría ser resultado de los compuestos antifúngicos que se evidenciaron en capítulos anteriores.-Posiblemente más adelante sea necesario continuar el ensayo y cultivar en medio de cultivo las estructuras de los patógenos para identificar si son realmente patógenos internos de semillas o externos que no fueron controlados con la desinfestación. En cualquiera de los dos casos, este resultado es sumamente positivo dado que las semillas pueden ser portadoras de hongos por fuera y por dentro que si no se controlan podrían generar plántulas anormales en condiciones de stress para las plantas.

Estos resultados vuelven a destacar el mayor potencial de una cepa con respecto a las otras y brindan información muy valiosa sobre la posibilidad de utilizar *P. fluorescens* para reducir el nivel inicial de ETV, así como la alternativa de su aplicación a las semillas, en el marco de un manejo integrado de estas enfermedades en Argentina.

## **CAPÍTULO N° 5**

### **DISCUSIÓN GENERAL**

---

El arroz es el cultivo regional más importante del litoral argentino, principalmente en Corrientes y Entre Ríos. La presencia de las enfermedades de tallo y vaina (ETV) ha incrementado con la incorporación de la siembra directa y del monocultivo de arroz. La disminución en el laboreo del suelo y la acumulación de un alto volumen de rastrojo contribuyen a mantener elevado el nivel de inóculo inicial de estas enfermedades. Además, las variedades más sembradas son susceptibles a dichas enfermedades (Quinteros 2009). Esto consecuentemente ha generado que en lotes con mucha historia de ETV, los rendimientos se vean afectados por vuelcos de plantas (Kraemer et al. 2011).

El control biológico de enfermedades es una herramienta necesaria dentro de un manejo integrado si se piensa en un manejo más sustentable del cultivo, pero el éxito del desarrollo de un producto biológico depende de varios factores: la efectividad biológica de las cepas, el conocimiento de sus mecanismos de acción, la posibilidad de una producción masiva y la adopción por los productores. En América Latina existen productos registrados a base de diferentes especies de hongos del género *Trichoderma* para control de patógenos en arroz (Bettiol et al. 2014). En Argentina hay disponible un producto a base de *Trichoderma* registrado para trigo (Gasoni 2014) pero hasta el momento en arroz, sólo se han evaluado cepas biológicas a nivel de laboratorio o de parcelas de ensayos a campo (Cúndom et al. 2002 y 2003; Pedraza et al. 2008 y 2009).

Como aporte al conocimiento y al potencial uso del control biológico de enfermedades en arroz, en Argentina, en este trabajo se llevó a cabo la caracterización fenotípica y genotípica de seis aislamientos nativos de *Pseudomonas* fluorescentes preseleccionados por su potencial biocontrolador sobre las ETV a partir del efecto observado directamente sobre la reducción de enfermedad en el campo (Pedraza et al. 2008 y 2009).

La primera etapa de la caracterización individual consistió en determinar *in vitro*, la producción de compuestos difusibles, volátiles, HCN, sideróforos y enzimas como mecanismos potenciales de biocontrol de los aislamientos contra los patógenos de las ETV. En el cuadro 5.1, se presentan en forma resumida los resultados de dicha caracterización.

**Cuadro 5.1.** Resumen de resultados del trabajo de investigación. Caracterización de los aislamientos nativos por sus potenciales mecanismos de acción, su identificación molecular y el efecto sobre las estructuras de perpetuación de los patógenos y sobre las semillas de arroz

Cepas	Caracterización molecular	Control del crecimiento de patógenos mediante						Producción de			Control de germinación de esclerocios			Control de hongos en semillas
		compuestos difusibles			compuestos volátiles			HCN <sup>nd</sup>	Sideróforos	Proteasas	R. o	R. s	S. o	
		R.o <sup>a</sup>	R. <sub>s</sub> <sup>b</sup>	S.o <sup>c</sup>	R.o	R.s	S.o							
M1A	<i>P. fluorescens</i> <sup>1</sup>	nd	nd	nd	(●)	nd	(●)	●	●	●	●●●	nd	nd	●●●
M1B	<i>P. fluorescens</i> <sup>2</sup>	●●	nd	nd	(●)	nd	nd	●●	●	●●	●●●	nd	nd	●●●
M1C	<i>P. fluorescens</i> <sup>3</sup>	●●	(●)	●●	(●)	(●)	(●)	●●●	●●	●●●	●●	nd	●●	●●●
M1E	<i>P. fluorescens</i> <sup>1</sup>	nd	nd	nd	(●)	nd	(●)	●●	●	●●	n.e.	n.e.	n.e.	n.e
M1F	<i>P. fluorescens</i> <sup>1</sup>	nd	nd	nd	(●)	nd	nd	●	●	●●	n.e.	n.e.	n.e.	n.e
M1G	<i>P. fluorescens</i> <sup>1</sup>	nd	nd	nd	(●)	nd	nd	●	●	●●	n.e.	n.e.	n.e.	n.e

**Patógenos:** R.o: *Rhizoctonia oryzae*. R.s: *R. solani*. S.o: *Sclerotium oryzae*. **Caracterización molecular:** <sup>1, 2 o 3</sup>. Diferentes patrones de bandas obtenidos a través de rep-PCR. **Difusibles:** ●● efecto de control observado a los 5 días de exposición (n=9). (●) efecto de control observado a los 2 días (n= 3). nd. Efecto de control no detectado. **Volátiles:** (●) efecto de control observado a los 9 días en 1 de 2 ensayos (n=9). **HCN (cianuro de hidrógeno):** ●●● producción alta. ●● producción intermedia. ● baja producción de HCN. **Sideróforos:** (●●) producción en medio CAS y KB (n=6). (●) producción en medio KB. **Proteasas:** ●●● hidrólisis total del medio LDA ●● hidrólisis parcial (n=9). **Efecto sobre germinación de esclerocios (n=5):** ●●● efecto de inhibición. ●● efecto de reducción, no total. (●) sin efecto de control. **Efecto sobre el desarrollo de hongos en semillas a 16°C (n=6).** ●●● efecto de control observado. n.e: no evaluado

En este aspecto, se encontraron diferencias entre las cepas en los mecanismos potenciales para el biocontrol y en la intensidad de los mismos evaluados cualitativamente (HCN, sideróforos y proteasas). Las diferencias más importantes, entre cepas, se observaron en las pruebas directas sobre los patógenos de ETV. La cepa M1C se destacó en la producción de HCN, sideróforos y proteasas y controló a dos de los patógenos evaluados.

La segunda etapa consistió en la identificación molecular de los seis aislamientos bacterianos (Cuadro 5.1.) Dichos aislamientos fueron pre-seleccionados en un medio de cultivo diferencial para *Pseudomonas fluorescens* (Pedraza et al. 2008), confirmados como pertenecientes al género *Pseudomonas* mediante cebadores específicos (Widmer et al. 1998). La variabilidad entre los aislamientos fue encontrada a nivel de cepa, no a nivel de especie, perteneciendo todos los aislamientos pertenecieron a la especie *fluorescens*. Dos cepas con patrones de bandas bien diferentes del resto demostraron también diferencias en los mecanismos de acción. La cepa M1C fue la más parecida al perfil de bandas de la cepa *P. fluorescens* utilizada como patrón, resultando también diferente al resto en la producción de metabolitos secundarios. Por su parte, la cepa designada como M1B mostró actividad para todos los mecanismos evaluados, pero sus metabolitos secundarios solamente afectaron a *R. oryzae*. Sorprendentemente, las cepas con patrones de bandas casi idénticos (M1A, M1E, M1F y M1G), mostraron variabilidad en algunos mecanismos de biocontrol. Algunas cepas produjeron efecto mediante metabolitos secundarios mientras que otras no mostraron dicho efecto (Cuadro 5.1). Esa heterogeneidad entre cepas de *P. fluorescens* ha sido informada en otros trabajos (Dawson et al. 2002), destacándose a la herramienta rep-PCR como la más consistente para detectar diversidad a este nivel. La variabilidad genética que detectamos entre cepas podría involucrar, al menos en parte, diferencias en la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica.

El otro aspecto que se investigó fue el tratamiento de los esclerocios de los patógenos con cultivos de las cepas de *P. fluorescens*. Las diferencias fueron evidentes entre las cepas bacterianas y el origen de los esclerocios. La cepa M1C afectó negativamente la germinación de esclerocios de *R. oryzae* y *S. oryzae* pero no fue efectiva sobre los esclerocios de *R. solani*. Por otra parte, las cepas restantes afectaron solamente a los esclerocios de *R. oryzae*. Estos resultados son sumamente alentadores ya que en Argentina, la Pudrición del Tallo producida por *S. oryzae* y la Mancha de la Vaina por *R. oryzae*, son las enfermedades con mayor frecuencia de aparición (Pedraza 2005; Gutiérrez y Cúndom 2008). Sumado a esto, la reducción del desarrollo fúngico durante la germinación a bajas temperaturas, cuando se aplicaron sobre las semillas cultivos de las cepas bacterianas, resulta de interés para un estudio futuro de tratamiento de semillas.

En resumen, los resultados obtenidos nos permiten confirmar en gran medida las hipótesis planteadas en el trabajo al demostrar que:

- las cepas aisladas e identificadas poseen multiplicidad de mecanismos de biocontrol para afectar a los patógenos de ETV. La caracterización de los mecanismos de biocontrol permitió identificar cepas con mejores atributos respecto a otras.
- Las cepas podrían ser útiles para disminuir el inóculo inicial de *R. oryzae* y *S. oryzae*, mediante la reducción de la germinación de sus esclerocios.
- Las cepas podrían ser utilizadas para reducir el desarrollo fúngico en semillas y mejorar la germinación y crecimiento de plántulas de arroz.

La ausencia de control sobre el patógeno *R. solani* abre el camino a futuras investigaciones en el control biológico de enfermedades en arroz, como por ejemplo aislar nuevos agentes con mayor capacidad de biocontrol sobre *R. solani* e investigar sobre la variabilidad de diferentes cepas del patógeno frente a los biocontroladores. Hay reportes en donde se señala la diferencia en la efectividad de los biocontroladores sobre los diferentes aislamientos del mismo patógeno. En este trabajo se utilizó un aislamiento representativo de *R. solani* pero la colección del laboratorio de Fitopatología cuenta con más de 20 aislamientos provenientes de diferentes regiones de arroceras del país.

Por otro lado, sería interesante evaluar la capacidad de M1C para el control de otros patógenos fúngicos, causantes de enfermedades foliares, entre ellos, *Pyricularia oryzae*, agente causal del Quemado del arroz, principal enfermedad del cultivo a nivel mundial y sobre *Cercospora oryzae*, *Bipolaris oryzae*, presentes en los cultivos año tras año, para lo cual se utiliza el control químico.

Estudiar posibles mecanismos de promoción de crecimiento de la M1C, sobre diferentes genotipos de arroz, en condiciones controladas y en invernáculo, partiendo de la base que manifestaron un efecto “protector” a bajas temperaturas, lo cual genera una nueva posibilidad de aplicarlas como protectores de la semilla durante los primeros estadios de la planta.

Determinar la viabilidad y persistencia de la cepa M1C en formulaciones para mejorar su efectividad y posibilitar su aplicación a campo.

En base a los resultados promisorios de *Pseudomonas aurantiaca 63Rc* en las determinaciones de mecanismos de biocontrol, efecto sobre esclerocios y sobre semillas, evaluar la *performance*, como agente de biocontrol en ensayos a campo.

El uso de cepas de *P. fluorescens* como ACBs ayudaría a contrarrestar las desventajas de las técnicas implementadas para el control de las ETV, como es sembrar con rastrojo sobre el suelo, como así también, reducir los efectos sobre la salud de los trabajadores, comunidades rurales y/o consumidores, por aplicaciones de agroquímicos. Este trabajo de investigación suma un paso más para llegar a la adopción de tecnologías que contribuirán en un futuro a la sustentabilidad de las producciones arroceras nacionales.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press, London. 830 p.
- Alexander, D, Zuberer, D. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12 (1): 39-45.
- Anitha, A, Das, M. 2011. Activation of rice plant growth against *Rhizoctonia solani* using *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma* and salicylic acid. *Research in Biotechnology*, 2: 7-12.
- Anzai Y, Kim H, Park J, Wakabayashi H, Oyaizu, H. 2000 Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1563–1589.
- Arora, N, Khare, E, Oh, J, Kang, S, Maheshwari, D. 2008. Diverse mechanisms adopted by fluorescent *Pseudomonas* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:581-585.
- Asociación Correntina de Plantadores de Arroz. ACPA 2014. Relevamiento Arroceros Nacional. <http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar>. [fecha de consulta: 10/05/2015].
- Asociación Correntina de Plantadores de Arroz. ACPA 2015. Relevamiento Arroceros Nacional. <http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar>. [fecha de consulta: 10/05/2015].
- Ávila, S, Deambrosi, E, Casales, L. 2004. Evaluación de momentos de aplicación de fungicidas para el control de las enfermedades del tallo. Pp 11-16 . En: *Resultados Experimentales 2003-2004* (eds). Capítulo 4: Manejo de Enfermedades. INIA. Uruguay.
- Ávila, S. y Deambrosi, E. 2006. Evaluación de momentos de aplicación de fungicidas. Pp 1-9. En: *Arroz Resultados Experimentales 2005-2006*. INIA Uruguay.
- Ayyadurai, N, Rabindrán, P, Sakthivel, N. 2007. Functional characterization of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* associated with rhizosphere soil of rice *Oryza sativa* L. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 176: 919-927.
- Baker, K. y. Cook, J. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 433 pag.
- Belmar, S, Jones, R, Starr, J. 1987. Influence of crop rotation on inoculum density of *Rhizoctonia solani* and sheath blight incidence in rice. *Phytopathology*, 77: 1138-1143.
- Benavidez, R. A. 2006. *El Arroz. Su cultivo y sustentabilidad en Entre Ríos*. UNER-UNL. ISBN, 950-698.
- Bergey, H. y Krieg, N. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1st Ed., Vol 1, The Willians and Wikins Co., Baltimore. Pp 104-110.
- Bettioli, W., Rivera, M., Mondino, P., Montealegre, A., y Colmenárez, Y. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. Facultad de Agricultura, Universidad de la República, Montevideo. 404 pag.
- Blanco, P., Molina, F., Ávila, S., Pérez De Vida, F. y Casales, L. 2004. Resistencia a enfermedades del tallo. Pp. 17-21. En: *Resultados Experimentales 2003-2004* (eds) Capítulo 5. Mejoramiento Genético. INIA. Uruguay.
- Bolsa de Cereales de Entre Ríos. 2014. Estimación de área sembrada, rendimiento y producción de arroz en Entre Ríos para la campaña 2013/14. <http://www.bolsacer.com.ar> [fecha de consulta: 10/05/2015].

- Bolsa de Cereales de Entre Ríos. 2015. Informe Superficie sembrada con arroz. <http://www.bolsacer.com.ar> [fecha de consulta: 10/05/2015].
- Bossis, E, Lemanceau, P, Latour, X, Gardan, L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20: 51-63.
- Castric, K, Castric, P. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 45:701–702.
- Castro da Silva, D, Barros Torres, D, Castro, L, Corsi, M, De Filippi, C, Barata, G. 2012. Rice sheath blight biocontrol and growth promotion by *Trichoderma* isolates from the Amazon. *Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 55 (4): 243-250.
- Catalá, M, Tomás, N, García, F, Torró, I, Martínez, M. 2011. Efecto del tratamiento fungicida de la semilla de arroz sobre el establecimiento del cultivo en el campo. Estación Experimental de l'IRTA d'Ampostà. *Producción Vegetal* 1-5 p.
- Cu, R, Mew, T, Cassman, K, Teng, P. 1996. Effect of sheath blight on yield in tropical, intensive rice production system. *Plant Disease*, 80 (10): 1103-1108.
- Chaiharn, M, Chunnaleuchanon, S, Lumyong, S. 2009. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal Microbiology of Biotechnology*, 25: 1919-1928.
- Chen, C, Belanger, R, Benhamou, N, Paulitz, T. 1999. Role of salicylic acid in systemic resistance induced by *Pseudomonas* spp. against *Pythium aphanidermatum* in cucumber roots. *European Journal of Plant Pathology*, 105:477–486.
- Cintas, N, Webster, R. 2001. Effects of rice straw management on *Sclerotium oryzae* inoculum, stem rot severity, and yield of rice in California. *Plant Disease*, 85:1140-1144.
- Cook, R, Thomashow, L, Weller, D, Fujimoto, D, Mazzola, M, Banger, G, Kim, D. 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 4197–201.
- Core, R, Team, R. 2015. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Cother, E, Nicol, H. 1999. Susceptibility of Australian rice cultivars to the stem rot fungus *Sclerotium oryzae*. *Australasian Plant Pathology*, 28: 85-91.
- Couillerot, O, Pringet-Combaret, C, Caballero-Mellado, J, Moëne-Loccoz, Y. 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent *Pseudomonas* as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Applied Microbiology*, 48: 505-512.
- Counce, P, Keisling, T, Mitchell, A. 2000. A Uniform, Objective and Adaptive System for Expressing Rice Development. *Crop Science*, 40: 436–443.
- Cúndom, M, Gutiérrez, S, Maza, S, Vallejos, G. 2002. Actividad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani*, patógeno de arroz. Resúmenes XIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas.
- Cúndom, M, Maza, S, Gutiérrez, S. 2003. Selection of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1:1-4
- Damicone, J, Patel, M, Moore, W. 1993. Density of sclerotia of *Rhizoctonia solani* and incidence of sheath blight in rice fields in Mississippi. *Plant Disease*, 77:257-270.

- Dandurand, L, Schotzko, D, Knudsen, G. 1997. Spatial patterns of rhizoplane populations of *Pseudomonas fluorescens*. Applied and Environmental Microbiology, 63: 3211-3217.
- Datnoff, L, Nemecek, S, Pemecky, K. 1995. Biological Control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. Biological Control, 5:427-431.
- Dawson, S, Fry, J, Dancer, B. 2002. A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent pseudomonads. Journal of Microbiological Methods, 50: 9-22.
- Duffy, B, Simon, A, Weller, D. 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. Phytopathology, 86:188-194.
- Di Rienzo, J, Casanoves, F, Balzarini, M, Gonzalez, L, Tablada, M, Robledo, C. 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Doetsch, R. 1981. Determinative methods of light microscopy, p. 21-33. En: Gerhardt, R, Murray, R, Costilow, E, Nester, W, Wood, N, Krieg y G. Phillips (eds.). Manual of methods for general microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Dowling, D, O'Gara, F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. Trends Biotechnology, 12: 133-141.
- Duan, G, Zhang, Z, Zhang, J, Zhou, Y, Yu, L, Yuan, Q. 2007. Evaluation of crude toxin and metabolite produced by *Helminthosporium graminearum* Rabenh for the control of rice sheath blight, in paddy fields. Crop Protection, 26: 1036-1041.
- Ferreira, S, Webster, R. 1976. Evaluation of virulence in isolates of *Sclerotium oryzae*. Phytopathology, 66: 1151-1154.
- Ferreira, E, Voss, M, Dos Santos, H, De-Polli, H, Neves, M, Rumjanek, N. 2009. Diversidade de *Pseudomonas* fluorescentes em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, 4 (2): 140-148.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. 2004. Año Internacional del Arroz. <http://www.fao.org> [fecha de consulta: 10/05/2015].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. 2014. <http://www.fao.org> [fecha de consulta: 10/05/2015].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO 2016. <http://www.fao.org> [fecha de consulta: 21/06/2016].
- Fundación Proarroz. 2014. Producción de Arroz en Argentina. Campaña 2012/2013. <http://www.proarroz.com.ar> [fecha de consulta 10/05/2015].
- Fundación Proarroz. 2015. Producción de Arroz en Argentina Campaña 2013/2014. <http://www.proarroz.com.ar>. [fecha de consulta 10/05/2015].
- García de Salamone, I, Di Salvo, L, Escobar Ortega, J, Boa Sorte, M, Urquiaga, S, Dos Santos Teixeira, K. 2010. Field response of rice paddy crop to inoculation with *Azospirillum*: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. Plant and Soil, 336: 351-362.
- García de Salamone, I, Funes, J, Di Salvo, L, Escobar-Ortega, J, D'Auria, F, Ferrando, L, Fernandez-Scavino, A. 2011. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense*

- and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. *Applied Soil Ecology*, 61: 196- 204.
- García de Salamone, I. 2012. Use of soil microorganisms to improve plant growth and ecosystem sustainability. Pp. 233-258. En: Mahmut, C (ed). *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*. InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/books/the-molecular-basis-of-plant-geneticdiversity/use-of-soil-microorganisms-to-improve-plant-growth-and-ecosystem-sustainability>. [fecha de ingreso: 10/06/2014].
- Garrido Rondoy, M. 2009. Manejo de la Pudrición de Tallos y Vainas del arroz. 31 p. Universidad Nacional de Tumbes. Perú.
- Gasoni, L. 2014. El INTA desarrolló el primer fungicida biológico del país. <http://inta.gob.ar/noticias/el-inta-desarrollo-el-primer-fungicida-biologico-del-pais>. [fecha de ingreso: 5/11/2014].
- Gnanamanickam, S, Mew. T. 1992. Biological Control of Blast Disease of rice with antagonistic bacteria and its mediation by *Pseudomonas* antibiotics. *Annals of Phytopathology Society of Japan*, 58: 380 -385.
- Gnanamanickam, S. Biological Control of Rice Diseases. 2002. En: *Biological Control of Crop Diseases*. (Ed). Marcel Dekker, 480 pag. New York, EEUU.
- Gnanamanickam, S. 2009. Biological control of rice diseases. Vol. 8. Springer Science y Business Media.
- Gregori, L. 2010. Respuesta a la fertilización nitrogenada en la relación largo ancho de hoja en diferentes genotipos de arroz *Oryza sativa* L. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes. 101 p.
- Gunnell, P, Webster, R. 1984. Aggregate sheath spot of rice in California. *Plant Disease*, 68: 529-531.
- Gupta, C, Kumar, P, Dubey, R, Maheshwari, D. 2006. Chitinase mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. *BioControl*, 51:821–835.
- Gutiérrez, S., Cúndom, M. 2008. Situación actual de las enfermedades fúngicas del cultivo de arroz en la provincia de Corrientes. En: *Comunicaciones científicas y tecnológicas 2008*. Universidad Nacional del Nordeste.
- Haas, D, Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual review of phytopathology*, 4 (1): 117-153.
- Haas, D, Défago, G. 2005. Biological Control of soil-borne pathogens by fluorescent Pseudomonads. *Nature Review Microbiology*, 3: 307-319.
- Häne, B, Jäger, K, Drexler, H. 1993. The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprints profiles than band matching algorithms. *Electrophoresis*, 14: 967-972.
- Hernández, A, Fernández, A., Pérez, J; Miranda, S., Fons, C., Hernández, A..... Santander J. L. 1999. Producción, purificación y diagnóstico de sideróforos a partir de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* J-1443. *Cultivos Tropicales* 20 (1): 21-25.
- Hernández, A, Rives, N, Caballero, A, Hernández, A, 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*, 1: 6-13.

- Hernández-Rodríguez, A, León-Plasencia, D, Rives-Rodríguez, N, Díaz de la Osa, A, Almaguer-Chávez, M, Acebo-Guerrero, Y. 2010. Identificación de aislamientos autóctonos de *Pseudomonas* fluorescentes con actividad antagónica ante *Curvularia* spp. *Revista de Protección Vegetal*, 3:181-189
- Internacional Rice Research Institute. Standard Evaluation Systems for Rice. International Rice Testing Program IRTIP. Los Baños, Philippines, IRRI. 44 p. <http://www.irri.org>.
- Ishii, S., Sadowsky, M. 2009. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental Microbiology*, 11(4), 733–740.
- evolution
- Jackson, L, Webster, R, Wick, C, Bolstad, J, Wilkerson, J. 1977. Chemical control of stem rot of rice in California. *Phytopathology*, 67(1): 1155-1158.
- Kazempour, M. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of Rice Sheath Blight, by antagonistic bacteria in greenhouse and field conditions . *Journal of Plant Pathology*, 3: 88–96.
- Khuel, R. Diseño de experimentos. 2001. En: Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones. Segunda edición. (Ed) S.A. Paraninfo. 666 p.
- Kotamraju, V. 2010. Management of sheath blight and enhancement of growth and yield of rice with plant growth-promoting rhizobacteria Thesis. Auburn University. 171 p.
- Kraemer, A, Moulin, J, Marín, A, Kruger, R, Herber, L. 2011. Manual del aguador arrocero: Principios básicos para el Manejo del Riego en el cultivo de Arroz. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Proyecto Arroz Corrientes. 24 p.
- Kumar, A, Singh, R, Jalali, B. 2003. Evaluation of resistance to stem rot and yield losses caused by the disease in rice. *Indian Phytopathology*, 56 (4): 403- 407.
- Kumar, K, Reddy, M, Kloepper, J, Yellareddygari, S, Lawrence, K, Zhou, X, Sudini, H, Miller, M, Appa, R, Surendranatha Reddy, E, Niranjana, S, Nayaka, C. 2011. Plant growth-promoting activities of *Bacillus subtilis* mbi 600 INTEGRAL® and its compatibility with commonly used fungicides in rice sheath blight management. *International Journal of Microbiology Research* 3: 120-130.
- Lanoiselet, V, Ash, G, Cother, E, Priest, M, Watson, A. 2001. First report of *Waitea circinata* causing sheath spot and *Rhizoctonia oryzae-sativae* causing aggregate sheath spot on rice in south-eastern Australia. *Australasian Plant Pathology*, 30:369-370.
- Lanoiselet, V, Cother, E, Ash, G, Harper, J. 2005a. Yield loss in rice caused by *Rhizoctonia oryzae* and *Rhizoctonia oryzae-sativae* in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 34:175-179.
- Lanoiselet, V, Cottier, E, Ash, G, Hind-Lanoiselet, T, Murray, G, Harper, J. 2005b. Prevalence and survival, with emphasis on stubble burning, of *Rhizoctonia* spp., causal agents of sheath diseases of rice in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 34(2): 135-142.
- Lanoiselet, V, Cother, E, Ash, G. 2007. Aggregate sheath spot and sheath spot of rice. *Crop Protection*, 26:799-808.
- Lawongsa, P, Boonkerd, N, Wongkaew, S, O’Gara, F, Teaumroong, N. 2008. Molecular and phenotypic characterization of potential plant growth-promoting *Pseudomonas* from rice and maize rhizospheres. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:1877-1884.

- Leeman, M, Den Ouden, F, Van Pelt, J, Cornelissen, C, Matamala-Garros, A, Bakker, P, Schippers, B. 1996. Suppression of fusarium wilt of radish by co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp. and root-colonizing fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 21-31.
- Lewis, J., Fravel, D. 1996. Influence of Pyrax/biomass preparations of biocontrol fungi on snap bean damping-off in the field caused by *Sclerotium rolfsii* and on germination of sclerotia of the pathogen. *Plant Disease*, 80: 655-659.
- Louws, F, Fulbright, D, Stephens, C, De Bruijn, F. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and environmental microbiology*, 60 (7): 2286-2295.
- Lucas, J, García-Cristob, J, Bonilla, A, Ramos, B, Gutierrez-Mañero, J. 2014. Beneficial rhizobacteria from rice rhizosphere confers high protection against biotic and abiotic stress inducing systemic resistance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82: 44-53.
- Lupski, J, Weinstock, G. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*, 174: 4525-4529.
- Madigan, M, Martinko, J, Parker, J. 2000c. Capítulo 5. Crecimiento Microbiano. En: Brock *Biología de los Microorganismos*. 8va edición. Isabel Capella (Ed). Madrid, España. 1064 p
- Madigan, M, Martinko, J, Parker, J. 2000a. Capítulo 15: Evolución sistemática y taxonómica microbiana. En: Brock. *Biología de los microorganismos*. 8va edición. Isabel Capella (Ed) Madrid, España. 1064 p.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. 2000b. Capítulo 16: Diversidad procariótica: dominio Bacteria. En: Brock. *Biología de los microorganismos*. 8va edición. Isabel Capella (Ed). Madrid, España. 1064 p.
- Malagrina, G. 2008. Efecto de diferentes prácticas de manejo en planta madre sobre la producción y calidad fisiológica de semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivar Cambá INTA-PROARROZ. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. 95 p
- Martínez, B, Reyes, Y, Infante, D, González, E, Baños, H, Cruz, A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Revista de Protección Vegetal*, 23:118-125.
- Mathivanan, N, Prabhavathy, V, Vijayanandraj, V. 2005. Application of Talc Formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma* varied Pers. ex S.F. Gray Decrease the Sheath Blight Disease and Enhance the Plant Growth and Yield in Rice. *Journal of Phytopathology*, 153: 697–701.
- Mazzola, M, Cook, R, Thomashow, L, Weller, D, Pierson, L. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:2616-2624.
- Meera, T, Balabaskar, P. 2012. Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens* from rice fields. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*, 2(1): 113-120.
- Mew T, Gonzalez, P. 2002. *A Handbook of rice seedborne fungi*. Los Baños Filipinas. IRRI.

- Mew, T, Rosales, A. 1986. Bacterization of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 76 (11): 1260-1264.
- Mew, T. y Misra, J. 1994. A Manual of rice seed health testing. (eds.) Manila, Philippines, International Rice Research Institute.
- Miller, T, Webster, R. 2001. Soil sampling techniques for determining to effect of cultural practices on *Rhizoctonia oryzae-sativae* inoculum in rice field soils. *Plant Disease*, 85:967-972.
- Miranda, S. 1998: Identificación y caracterización en cuanto a producción de sideróforos de cepas de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. Tesis de grado. Universidad de La Habana.. La Habana. 56 p. <http://www.monografias.com/trabajos36/metabolito-bacteriano/metabolito-bacteriano2.shtml>. [Fecha de ingreso: 14/08/2016].
- Montealegre, J, Reyes, R, Perez, L, Herrera, R, Silva, P, Besoain, X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6:115-127.
- Migula, W. 1894. Ueber ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe* 1 235-238 (in German).
- Moore, E, Mua, M, Arnscheidt, A, Eottger, E, Hutson, R, Collins, M, Van de Peer, Y, De Wachter, R, Timmis, K, 1996. The determination and comparison of the 16S rDNA gene sequences of species of the genus *Pseudomonas (sensu stricto)* and estimation of the natural intrageneric relationships. *Systematic and Applied Microbiology* 19:476-492.
- Naeimi, S, Okhovvat, S, Javan-Nikkhah, M, Vágvölgyi, C, Khosravi, V, Kredics, L. 2011. Biological control of *Rhizoctonia solani* AG1-1A, the causal agent of rice sheath blight with *Trichoderma* strains. *Phytopathología Mediterranea*, 49 (3): 287-300.
- Naiman, A, Latrónico, A, García de Salamone, I. 2009. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. *European Journal of Soil Biology*, 45:44-51.
- Nandakumar, R, Subramanian, B, Radjacommare, R, Raguchander, T, Samiyappan, R. 2002. *Pseudomonas fluorescens* mediated antifungal activity against *Rhizoctonia solani* causing sheath blight in rice. *Phytopathología Mediterránea*, 41, 109-119.
- Naureen, Z, Price, A, Hafeez, F, Roberts, M. 2009. Identification of rice blast disease-suppressing bacterial strains from the rhizosphere of rice grown in Pakistan. *Crop Protection*, 28:1052-1060.
- Nayar, N. 2014. Rice in the world. En. *Origin and Phylogeny of rice*. 305 p.
- Neilands, J. 1993. Siderophores. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 302: 1-3.
- Nezarat, S. y Golami, A. 2009. Screening plant growth promoting rhizobacteria germination, seedling growth and yield. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 121: 26-32.
- Nico, M, Ribaldo, C, Gori, J, Cantore, M, Curá, J. 2011. Uptake of phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants *Oryza sativa* inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Applied soil ecology*, 61: 190-195.
- Oda, Y, Wanders, W, Huisman, L, Meijer, W, Gottschal, J, Forney, J. 2002. Genotypic and phenotypic diversity within species of purple nonsulfur bacteria isolated from aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (7): 3467-3477.

- O'Sullivan, D, O'Gara, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Reviews*, 56: 662-676.
- Ou, S. 1985. *Rice Diseases*. 2d. (Ed). Kew, Surrey, England, CMI.
- Palleroni, N, Kunisawa, R, Contopoulou, R, Doudoroff, M. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(4), 333-339.
- Palleroni, N. 2008. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. Pp 1-18. En: *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology* ed. Cornelis, P. Hethersett, U.K: Caister Acad Press.
- Papavizas, G, Collins, D. 1990. Influence of *Gliocladium virens* on germination and infectivity of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 80 (7): 627-630.
- Pedraza, M. 2005. Principales actividades sobre enfermedades del cultivo en la EEA Concepción del Uruguay del INTA. Pp117-127. En: XVI Resultados Experimentales 2004-2005 INTA ProArroz.
- Pedraza, M y Asselborn, M. 2006. Evaluación de fungicidas para el control de enfermedades provocadas por *Rhizoctonia* spp. y *Sclerotium oryzae*. Pp. 109-115. En: XVII Resultados Experimentales INTA ProArroz 2005-2006.
- Pedraza, M, Asselborn, M, Pirchi, J, Arguissain, G y Livore, A. 2007. Effect of genotype, irrigation and nitrogen on diseases incidence in a rice field crop. Pp. 326-327. En: 4 th Temperate Rice Conference. Novara. Italia.
- Pedraza, M, Asselborn, M, Cattaneo, F, Liberman, C, Clemente, G. 2008. Alternativa biológica para el manejo de la Pudrición del Tallo en arroz *Sclerotium oryzae*. p 224. En: 1° Congreso Argentino de Fitopatología. Córdoba. Argentina.
- Pedraza, M, Asselborn, M, Liberman, C, Restelli, Y, Clemente, G. 2009. Control biológico de enfermedades de tallo y de vaina con *Pseudomonas* fluorescentes. p. 58. En: XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Santiago del Estero. Argentina.
- Pedraza, M, Asselborn, M, Liberman, C, Colazo, J; Cattáneo, F, Livore, A. 2010. Trabajando por la sanidad del cultivo. Pp. 105-114. En: XIX Resultados Experimentales INTA ProArroz..
- Pedraza, M y Asselborn, M. 2014. Estudios realizados en la sanidad del cultivo de arroz con el apoyo de la Fundación Proarroz. Pp. 153- 173. En: XXIII Resultados Experimentales INTA ProArroz.
- Porteous, A, Widmer, F, Seidler, R. 2002. Multiple enzyme restriction fragment length polymorphism analysis for high resolution distinction of *Pseudomonas sensu stricto* 16S rRNA genes. *Journal of Microbiological Methods*, 51:337-348.
- Prabavathy, V, Mathivanan, N, Murugesan, K. 2006. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. *Biological Control*, 39(3): 313-319.
- Prabhu, A, Filippi, M, Silva, G, Santos, G. 2002. Resistencia de cultivares de arroz a *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia oryzae*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 37: 589-595.
- Puente, M, García, J, Maroniche, G, Arguissain, G, Pirchi, H, Peticari, A. 2013. Plant-growth promotion of argentinean isolates of *Azospirillum brasilense* on rice *Oryza sativa* L. under controlled and field conditions. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environment Science*, 13:1361-1369.
- Quinteros, C. 2009. Factores limitantes para el crecimiento y productividad del arroz en Entre Ríos, Argentina. Tesis Doctoral. Universidade da Coruña, España. 167 p.

- Raaijmakers, J, Bonsall, R, Weller, D. 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 89: 470-475.
- Raaijmakers, J, Weller, D. 2001. Exploiting genotypic diversity of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior rootcolonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:2545–2554.
- Raaijmakers, J, Vlami, M, de Souza, J. 2002. Antibiotic production by bacterial bio control agents. *Antonie van Leeuwenhoek Journal*, 81: 537–547.
- Ramesh, R, Joshi, A, Ghanekar, M. 2009. Pseudomonads: Major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 47-55.109.
- Ramezanpour, M, Popov, Y, Khavazi, K, Rahmani, H. 2010. Genetic diversity and efficiency of Indole Acetic Acid Production by the isolates of fluorescent Pseudomonads from rhizosphere of Rice (*Oryza sativa* L.). *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 7 (1): 103-109.
- Rapauch, G, Kloepper, J. 1998. Mixtures of plant growth–promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88:1158-1164.
- Reddy, K, Choudary, A, Reddy, M. 2007. Antifungal metabolites of *Pseudomonas fluorescens* isolated from rhizosphere of rice crop. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 37: 280-284.
- Rezzonico, F, Zala, M, Keel, C, Duffy, B, Moënne-Loccoz, Y, Défago, G. 2007. Is the ability of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* to produce the antifungal metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection. *New Phytologist*, 173: 861-872.
- Rives, N, Acebo, Y, Almaguer, M, García, J, Hernández, A. 2009. Actividad antagónica frente a *Pyricularia grisea* SACC. y fitoestimulación en el cultivo del arroz de cepas autóctonas de *Pseudomonas putida* TREV. *Revista de Protección Vegetal*, 24:106-116.
- Rodicio, M, Mendoza, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 22:238-245.
- Rosales, R, Vantomme, J, Swings, J, Ley, D, Mew, T. 1993. Identification of some bacteria from paddy antagonistic to several rice fungal pathogens. *Journal of Phytopathology*, 138: 189-208.
- Rosas, S, Pastor, N, Guñazú, L, Andrés, J, Carlier, E, Vogt, V, Bergesse, J, Rovera, M. 2012. Efficacy of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1 for improving productivity of several crops. En: Peeyush, S. (ed). *Crop Production Technologies*. In Tech. Available from: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/25587/InTech-efficacy\\_of\\_Pseudomonas\\_chlororaphis\\_subsp\\_aurantiaca\\_sr1\\_for\\_improving\\_productivity\\_of\\_several\\_crops.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/25587/InTech-efficacy_of_Pseudomonas_chlororaphis_subsp_aurantiaca_sr1_for_improving_productivity_of_several_crops.pdf). pp. 199-210.
- Ruiz, R, Martínez, S, Escalante, F, Bettucci, L, Lupo, S. 2013. Control biológico de hongos patógenos *Sclerotium oryzae*, *Rhizoctonia oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae* en cultivos de arroz mediante cepas nativas de *Trichoderma* spp. En: *Encuentro Nacional de Microbiólogos*. Montevideo. Uruguay. Fuente: <http://www.ainfo.inia.uy>. Fecha de ingreso: [22/06/14].

- Ruta de Arroz. 2014. Crecimiento en el mundo [http://. www.rutadearroz.com.ar](http://www.rutadearroz.com.ar). [fecha de consulta: 10/05/2015].
- Rush, R. 1992. Sheath Blight. pp. 22-25. En: Compendium of rice diseases. APS Press, St. Paul, MN, USA. Webster, R., Gunnell, P. (eds).
- Saravanakumar, D, Lavanya, N, Muthumeena, K, Raguchander, T, Samiyappan, R. 2009. Fluorescent pseudomonad mixtures mediate disease resistance in rice plants against sheath rot *Sarocladium oryzae* disease. *Biocontrol*, 54: 273-286.
- Sakthivel, N, Gnanamanicham, S. 1987. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Environmental Microbiology*, 153:2056-9.
- Savary, S, Castilla, N, Willocquet, L. 2001. Analysis of the spatio-temporal structure of rice sheath blight epidemics in a farmer's field. *Plant Pathology*, 50: 53-68.
- Schwyn, B, Neilands, J. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160: 45-56.
- Shanmugam, V, Singh Ajit, N, Verma, R, Sharma, V. 2008. Diversity and differentiation among fluorescent pseudomonads in crop rhizospheres with whole-cell protein profiles. *Microbiological Research*, 163: 571-578.
- Siddiqui, I, Shaukat, S. 2003. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 1615-1623.
- Sneath, P. y Sokal, R. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. WH Freeman and Co, San Francisco.
- Spurlock, T, Rothrock, C, Monfort, W, Griffin, T. 2016. The distribution and colonization of soybean by *Rhizoctonia solani* AG11 in fields rotated with rice. *Soil Biology and Biochemistry*, 94: 29-36.
- Te-Tzu, C. 2003. Origin, domestication and diversification. Pp 1-7. En: Smith CW and Dilday RH (eds). Rice: origin, history, technology and production. Wiley, John and Sons, Incorporated. U.S.A.
- Thomashow, L, Weller, D. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology*, 170: 3499-3508.
- Torsten, H, Frank, B, Peter, W. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, 50 (3): 346-363.
- Vasanth Devi, T, Malar Vizhi, R, Sakthivel, N, Gnanamanickam, S 1989. Biological control of sheath-blight of rice in India with antagonistic bacteria. *Plant and Soil*, 119: 325-330.
- Vasudevan, P, Kavitha, S, Priyadarisini, B, Babujee, L, Gnanamanickam, S. 2002. Biological control of rice diseases. En: Biological Control of Crop Diseases. (Ed). Marcel Dekker, 480 p. New York, EEUU.
- Vermelho, A, Meirelles, M, Lopes, A, Petinate, S, Chaia, A, Branquinha, M. 1996. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:755-760.
- Versalovic, J, Koeuth, T, Lupski, J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 24: 6823-6831.

- Versalovic, J, Schneider, M, de Bruijn, F, Lupski, J.1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Cell Biology*, 5: 25-40.
- Viswanathan, R, Samiyappan, R. 2002. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. *Crop Protection*, 21: 1-10.
- Webster, R. y Bockus W. 1978. Effects of various methods of rice straw disposal on the epidemiology of rice stem rot. Pp 78-105. En: California States Air Resources Board (eds). Department of Plant Pathology. University of California.
- Webster, R. 1992. Stem Rot. Pp. 21-22. En: Webster, R. y Gunnell, P. (eds). *Compendium of rice diseases*. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Weller, D. 2007. Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopatology*, 97: 250:256.
- Widmer, F, Seidler, R, Gillevet, P, Watrud, L, Di Giovanni, G. 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas Sensu Stricto* in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (7): 2545–2553.
- Yang,H, Chaowagul, W, Sokol, P. 1991. Siderophore production by *Pseudomonas pseudomallei*. *Infection and Immunity*, 59 (3): 776-780.
- Yang, C, Hamel, C, Vujanovic, V, Gan, Y. 2011. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *International Scholarly Research Network Ecology*, 2011: 1-8.