

INTERACCION DE DOS HONGOS TOXICOGENICOS CON UNA CEPA DE STREPTOMYCES SOBRE EL DESARROLLO DE PLANTAS DE TRIGO

Cecilia L. Fulgueira*, Alfredo L. Borghi*

Marta A. Gattuso*, Susana J. Gattuso**

Blanca J.C. de Bracalenti*

*Centro de Referencia de Micología (CEREMIC)

**Cátedra de Botánica.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.

Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531

2000 Rosario-República Argentina.

Palabras clave: Antagonismos, *Streptomyces*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium tricinctum*, plantas de trigo.

Key words: Antagonism, *Streptomyces*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium tricinctum*, wheat seeds.

RESUMEN

Entre los microorganismos antagonistas de los suelos donde se cultivan cereales se hallan *Streptomyces* capaces de producir sustancias inhibitoras que pueden afectar la viabilidad y capacidad de diseminación de distintas especies de *Aspergillus* y *Fusarium* y su capacidad para producir aflatoxinas y trichotecenos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la interacción entre hongos toxicogénicos (*Aspergillus parasiticus* y *Fusarium tricinctum* NRRL 3299) y *Streptomyces* sp. antagonistas del crecimiento de tales hongos sobre el desarrollo de plantas de trigo.

Se realizaron las siguientes actividades: a) inoculación de semillas de trigo, con el *Streptomyces* inhibidor, b) estudio del poder germinativo de las semillas de trigo, c) cultivo en cámara invernáculo de semillas inoculadas y sin inocular sembradas en tierras con y sin los hongos toxicogénicos, d) comprobación de la invasividad o ataque de los hongos mediante el rociado de espigas de plantas provenientes de suelos infectados con una suspensión de conidios de los hongos infectantes, e) determinación de las variaciones en las características botánicas de las plantas de trigo.

Se pudo concluir que: 1) la presencia de hongos toxicogénicos no alteró el poder germinativo de las semillas de trigo, 2) el desarrollo vegetal, número y peso promedio de los granos de las plantas provenientes de suelos infectados con los hongos toxicogénicos fué significativamente mayor al de las plantas crecidas en tierra estéril, 3) el estudio anatómico de las plantas no puso en evidencia invasión o ataque por parte de los hongos.

SUMMARY

[Interaction of two toxigenic fungi with a strain of *Streptomyces* on the development of wheat seeds.]

Streptomyces capable of producing inhibitory substances that may affect the viability and disseminating different species of *Aspergillus* and *Fusarium* and their capacity to produce aflatoxins and trichothecenes, are found among the antagonist microorganism of the soils where cereals are grown.

The object of this work was to evaluate the effect of the interaction among toxicogenic fungi (*Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 and *Fusarium tricinctum* NRRL 3299) and antagonistic *Streptomyces* sp on the development of wheat plants.

The following activities were carried out: a) inoculation of wheat seeds with inhibitor *Streptomyces*, b) analysis of the germinative power of the inoculated seeds, c) culture in hot-house and culture of non-inoculated seeds in lands with and without toxigenic fungi, d) spray of spikes of the infected fungi, e) determination of the variances in the botanical features of wheat plants.

It was concluded that: 1) the presence of toxicogenic fungi did not alter the germinative power of seeds of wheat; 2) the vegetal development, number and weight, of the average grains of the plants from infected soils was significantly greater than the development of the plants grown in non-fertile soil; 3) the anatomic study of the plants did not shown evidence of invasion of fungi.

INTRODUCCION

El problema de la preservación de granos de cereales y oleaginosas al ataque de hongos productores de toxinas altamente peligrosas para la salud humana y animal, ha sido y es motivo de investigaciones importantes (1).

En los granos en desarrollo y durante el almacenamiento post-cosecha, los hongos son expuestos a interacciones complejas con la especie hospedera. Su condición fisiológica y su crecimiento dependen de varios factores como la presencia de otros microorganismos, de los biocidas aplicados en distintas etapas de desarrollo de la semilla o de los preservativos empleados durante el almacenamiento (2).

La competición entre organismos, es uno de los factores más importantes que determinan la densidad de poblaciones en la naturaleza.

Los *Streptomyces* por su amplia distribución, tolerancia térmica, alto potencial metabólico, probada capacidad como antagonistas fúngicos, su buen crecimiento filamentoso en los suelos y la producción de antibióticos, pueden participar activamente en el establecimiento del equilibrio microbiológico del suelo y constituirse en un factor que afecta la viabilidad y capacidad de ciertos hongos como el *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y distintas especies de *Fusarium* (3,4).

En una etapa previa, se seleccionó una cepa de *Streptomyces* sp. entre todas aquellas aisladas de suelo que produjeron inhibición del *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 y del *Fusarium tricinctum* NRRL 3299. Probandose "in vitro" su poder antagonista sobre la germinación y el crecimiento de los mencionados hongos y determinandose si tal acción era debida a antagonismo o competencia. Se demostró en los estudios realizados que, cuando el *Streptomyces* sp. creció conjuntamente con el *A. parasiticus* y con el *F. tricinctum* alteró la germinación y el crecimiento de estos hongos, siendo la etapa de desarrollo de este, determinante en sus efectos y atribuibles a la producción de metabolitos inhibidores por parte del *Streptomyces*, que actuarían sobre la germinación de los conidios más que a una competición por el sustrato (5,6).

El problema en salud vegetal, comienza con la germinación de la semilla. Si ésta se mantiene bien nutrida y provista de carbohidratos, la germinación será rápida y la microvida a su alrededor compuesta por bacterias y varios hongos, entre ellos, *Aspergillus* y *Penicillium*, la beneficiará acelerando su germinación. Pero cuando sucede lo contrario, los microorganismos la atacarán, actuando como descomponedores, lo que imposibilitará su germinación a futuro (7).

Por ésto se decidió adicionar a los estudios "in vitro" citados anteriormente, pruebas en el mismo suelo donde se cultivan cereales.

Para ello se llevaron a cabo las siguientes actividades:

1.- Inoculación experimental de semillas de trigo con el *Streptomyces* inhibidor.

2.- Estudio del poder germinativo de dichas semillas inoculadas.

3.-Experiencias en cámara-invernáculo de cultivo de semillas de trigo inoculadas y sin inocular, en tierras con y sin la presencia de los hongos toxicogénicos, para determinar la efectividad del *Streptomyces* (presente naturalmente en el mismo suelo donde se desarrollan los cereales) como agente inhibidor contra los hongos en condiciones de campo.

MATERIALES Y METODO

1) Preparación del homogenizado del antagonista. - Para usar en inoculación de superficie, la cepa *Streptomyces* sp. C/33-6 aislado de suelo, fué cultivado en Agar Papa Dextrosa en placas de Petri a 28°C durante 7 días. Luego el contenido de todas las placas fué raspado y colocado en un agitador Wering junto con 20 ml de agua por placa de Petri y agitado por 30 segundos. Finalmente 5 ml. de solución de goma arábica (0,2 g/ml) fueron agregados a este homogenizado. Parte de las semillas de trigo fueron sumergidas en él para inocularlas con el *Streptomyces* antagonista (8).

2) Preparación del inóculo-stock del patógeno. - Para infectar el suelo de las macetas con los hongos toxicogénicos, se utilizó tierra especial (compost). Esta fué esterilizada previamente 4 horas a 121°C en autoclave, en 4 bolsas de papel conteniendo aproximadamente 500 g. cada una. Después de enfriado, el contenido fue transferido a sendas bolsas de polietileno.

Por otro lado, los cultivos agitados de *A. parasiticus* NRRL 2999 y *F. tricinctum* NRRL 3299 desarrollados en Caldo Papa Dextrosa (CPD) a 28°C por 7 días, fueron diluídos con 5 partes de CPD. Veinte ml de estos cultivos diluídos fueron colocados en cada bolsa de polietileno (dos para cada hongo). Las bolsas fueron agitadas con la mano para humedecer e inocular todo el contenido y finalmente fueron colocadas en estufa a 28°C. Todos los días las bolsas fueron abiertas y agitadas muchas veces para aireación y luego cerradas de nuevo.

Después de 21 días de incubación el contenido de las bolsas infectadas (inóculo-stock) estuvo listo para la inoculación en la tierra de las macetas.

3) **Estudio del poder germinativo de las semillas de trigo.**- Se utilizaron semillas de trigo variedad Marco Juárez INTA, a las que se les probó su poder germinativo en las siguientes condiciones: a) En placas de Petri con discos de papel de filtro humedecidos, se colocaron 50 semillas de trigo por caja y se incubaron 3 días a 28°C, al cabo de los cuales se determinó el porcentaje que emitió radícula; b) Se determinó de la misma manera el poder germinativo de las semillas de trigo inoculadas con *Streptomyces*; c) Se estudió también el poder germinativo de las semillas inoculadas con *Streptomyces*, pero en presencia de *A. parasiticus* NRRL 2999. Para ello se prepararon placas de APD sobre las que se sembró una suspensión de conidios del *Aspergillus* y sobre ellas se depositaron las semillas de trigo inoculadas con *Streptomyces*; d) Se determinó también el poder germinativo de semillas de trigo inoculadas con *Streptomyces*, colocadas sobre placas de APD en las que se había sembrado previamente una suspensión de conidios de *F. tricinctum* NRRL 3299.

4) **Siembra de las semillas de trigo.**- La siembra se efectuó en macetas, a razón de 10 semillas en cada una. A cada maceta, que contenía una base de tierra natural suplementada con una capa de tierra estéril, le correspondió un tratamiento distinto de acuerdo a la Tabla N° 1.

Tabla N° 1

Esquema de siembra de las semillas de trigo en las distintas macetas.

	Semillas sin inocular	Semillas inoculadas
Tierra Esteril	Maceta N° 1	Maceta N° 2
Tierra Esteril + <i>Fusarium</i>	Maceta N° 3	Maceta N° 4
Tierra Esteril + <i>Aspergillus</i>	Maceta N° 5	Maceta N° 6

Todas las macetas fueron colocadas en una cámara-invernáculo durante 120 días, mantenidas a una temperatura entre 25-28°C, a una humedad relativa entre 60-80% y con un fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad.

A los 30 días de la siembra se retiró una plántula de cada maceta y se procedió a su fijación con formol-alcohol-ácido acético (F.A.A.), incluyendo en parafina, cortando en forma seriada (9,10) los siguientes órganos: raíz embrional, raíz adventicia, mesocótilo,

tallo con coleóptilo, nomófilos y nudo cotiledoneal. Todo esto coloreado con Safranina-Fast Green (11).

A los 64 días se rociaron tres espigas de la maceta N° 3 con una suspensión que contenía $6,2 \times 10^5$ conidios de *F. tricinctum* NRRL 3299/ml. y tres espigas de la maceta N° 5 con una suspensión de $7,5 \times 10^5$ conidios de *A. parasiticus* NRRL 2999/ml.

A los 77 días se rociaron de manera similar tres espigas de la maceta N° 4 con *F. tricinctum* y tres espigas de la maceta N° 6 con *A. parasiticus*.

A los 7, 15 y 21 días de efectuado el rociado, se seleccionaron cariopsis, se cortaron por el surco longitudinal (8,9), se fijaron con F.A.A., se incluyeron en parafina, se cortaron longitudinalmente y colorearon con Safranina-Fast Green.

Los granos de almidón fueron analizados con luz polarizada.

Al cabo de los cuatro meses de incubación, se retiró las macetas de la cámara, se separó la porción aérea de cada planta y se determinó:

- Peso seco de la porción aérea colocando las plantas en una estufa a 60°C durante 48 horas hasta determinación de peso constante.
- Número de espigas producidas.
- Número y peso seco de los granos obtenidos a partir de tales plantas.

Una vez seccionada la porción aérea se extrajo las raíces de las plantas, lavándolas con agua destilada, se sembró las suspensiones así obtenidas en placas de APD y se incubaron a 28°C durante 7 días para determinar la presencia o no de los hongos inoculados.

Se determinaron además los datos fenológicos correspondientes al tiempo de emergencia y espigazón de las distintas macetas.

RESULTADOS

El estudio del poder germinativo de las semillas de trigo arrojó los siguientes resultados: en los casos a) y b) el 99% de las semillas emitieron la radícula y en los casos c) y d) se observó germinación en el 98% de las semillas. Los resultados obtenidos en la determinación de los pesos secos de la porción aérea de cada planta se presentan en la tabla N° 2. Se efectuó el análisis estadístico de los resultados por comparación de los promedios de a dos, utilizando la variable t-Student y considerando la estimación de la varianza de error a partir de la combinación de las varianzas de los 6 grupos (en base a la igualdad estadística de varianzas por el método de Battlet).

La comparación de los promedios de los pesos

secos y su significación estadística se muestran en la Tabla N° 2.

Tabla N° 2

Comparación entre los promedios por maceta de los pesos secos de la porción aérea de las plantas de trigo y su significación estadística

Macetas N°	Pesos Secos Promedios (g)	Significación Estadística
2 - 1	0,6433 - 0,6076	No significativa
3 - 1	1,8187 - 0,6076	Significativa
4 - 2	2,0784 - 0,6433	Significativa
4 - 3	2,0784 - 1,8187	No significativa
5 - 1	1,6164 - 0,6076	Significativa
5 - 3	1,6164 - 1,8187	No significativa
6 - 2	1,5014 - 0,6433	Significativa
4 - 6	2,0784 - 1,5014	No significativa
5 - 6	1,6164 - 1,5014	No significativa

El número de espigas producidas en promedio por planta y el número y peso seco promedio de los granos obtenidos a partir de tales espigas correspondientes a los distintos tratamientos se presentan en la Tabla N° 3.

Tabla N° 3

Número promedio de espigas producidas por planta, y número y peso seco promedios de los granos obtenidos a partir de tales espigas, correspondientes a los distintos tratamientos

Maceta N°	N° de Espigas Promedio	N° de Granos Promedio	Peso de Granos Promedio
1	1,333	1,167	0,0288
2	1,4	--	--
3*	2,555	8,942	0,3194
3	2,555	9,368	0,2789
4*	2,0	6,667	0,2533
4	2,0	11,231	0,3444
5**	2,889	--	--
5	2,889	6,861	0,1951
6**	1,555	20,249	0,7344
6	1,555	7,775	0,2575

Plantas rociadas con una suspensión de conidios del *F. tricinctum* (*) o del *A. parasiticus* (**)

El estudio morfológico y anatómico de las plántulas reveló las siguientes particularidades:

Maceta N° 2: mesocótilo largo.

Macetas N° 3 y 4: mesocótilo corto o nulo y raíz

adventicia gruesa.

Maceta N° 5: plántula pequeña, sin raíces adventicias y mesocótilo muy largo.

Maceta N° 6: mesocótilo corto y raíces adventicias originadas del nudo basal y del nudo del coleóptilo.

El estudio anatómico de los diferentes órganos no puso en evidencia invasión o ataque por parte de los hongos.

Morfológicamente los cariopsis rociados con conidios fúngicos mostraron diferencias con respecto al material sin rociar, pues resultaron granos de mayor volumen (Fig. 1).

El estudio de los cariopsis testigos mostró una anatomía normal (Fig. 2-A).

Los cariopsis rociados con la suspensión de conidios de *Aspergillus* a los 7 días de tratamiento mostraron en la capa de aleurona (a) del embrión un precipitado fino, oscuro y poco denso (p) el que también se encontró presente en escasa cantidad a nivel del escutelo (e) (Fig. 2-B). A los 15 días se intensificó este precipitado, aumentó su dispersión y se hizo visible en las regiones apicales caulina (c) y radical (r) (Fig. 2-C). A los 21 días el fenómeno fué más intenso (Fig. 2-D)). El endosperma amiláceo (s) y el pericarpio (m) no se vieron afectados.

Los cariopsis rociados con *Fusarium* mostraron a los 7 días del tratamiento en la capa de aleuronas (a) del embrión un precipitado grueso y oscuro que también se encontró en forma abundante en el escutelo (e). La región del endosperma amiláceo (s) adosada a la capa aleuronífera presentó algunas células con un contenido no estructurado (x) que se coloreó de rojo con la Safranina (Fig. 2-E). A los 15 y 21 días los procesos descritos se intensificaron ((Fig. 2-F-G). Con este tratamiento el pericarpio no fué afectado.

En los cultivos obtenidos a partir de la tierra extraída de la rizosfera de las macetas N° 5 y 6, se aisló predominantemente *A. parasiticus* NRRL 2999 mientras que en las macetas N° 3 y 4, *F. tricinctum* fue recuperado, pero junto con otras cepas fúngicas ambientales.

Los datos fenológicos correspondientes a las semillas de trigo en las condiciones del experimento, revelaron que: transcurrieron 4 días desde la siembra a la emergencia en todos los casos, además en las macetas infectadas la espigazón comenzó a los 49 días después de la emergencia mientras que en las macetas sin infectar ésta se retrasó hasta los 64 días.

DISCUSION

A través del análisis de los datos experimentales obtenidos podemos concluir que:

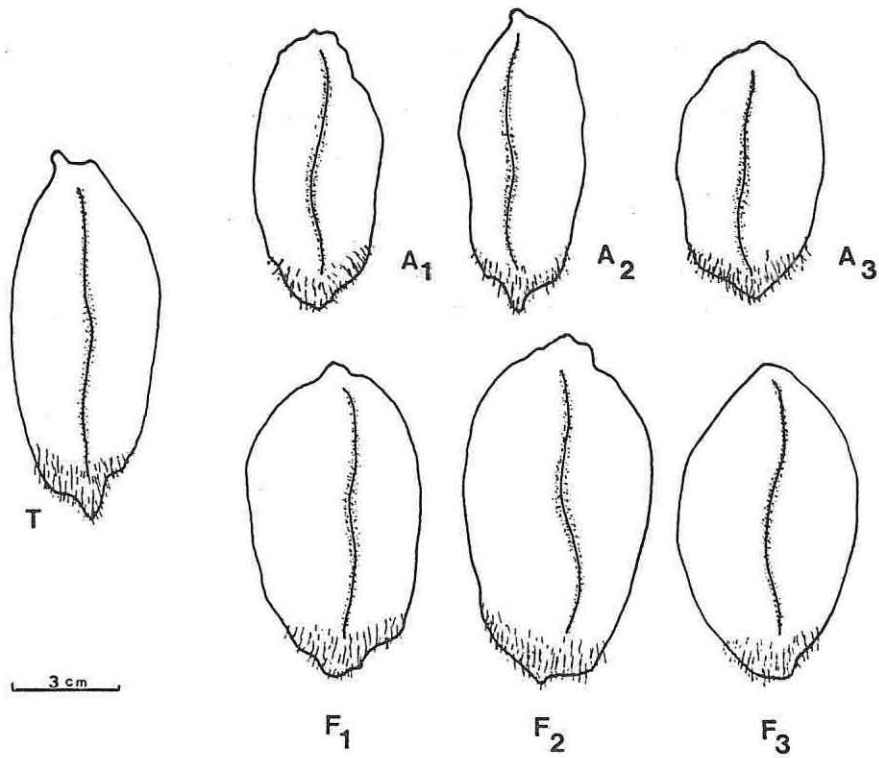


Fig. 1: Variaciones morfológicas en *Triticum sativum* (T) producidas por el rociado de sus espigas con conidios de *A. parasiticus* NRRL 2999 (A1, A2, A3) o de *F. tricinctum* NRRL 3299 (F1, F2, F3).

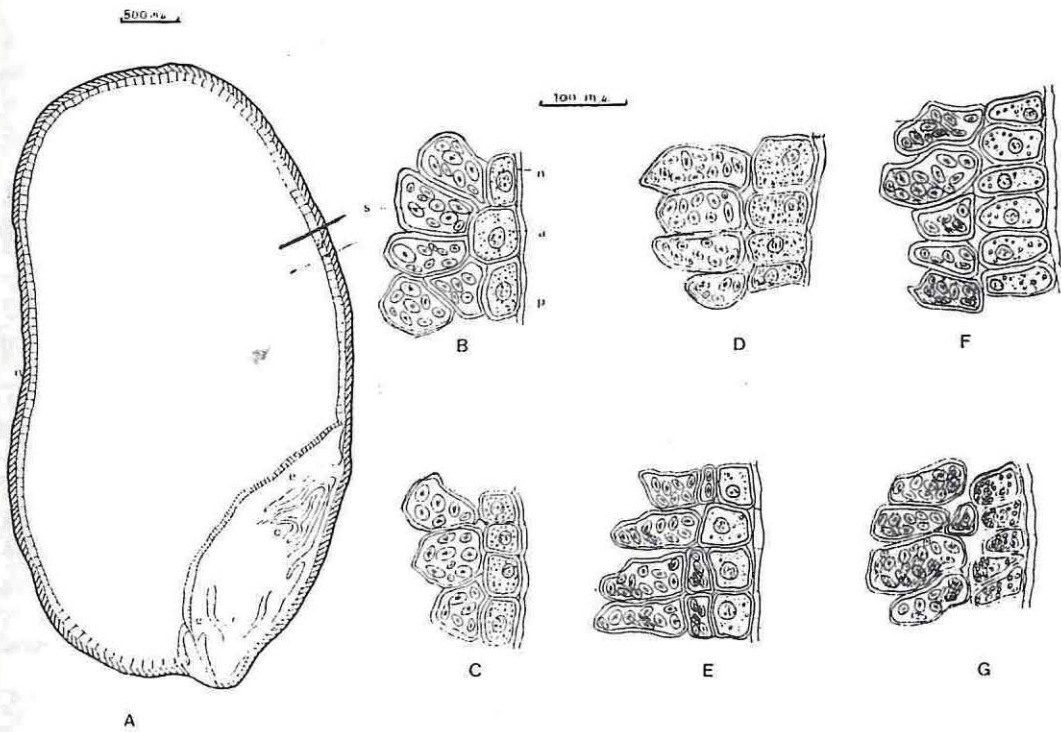


Fig. 2: Variaciones histológicas observadas en cortes longitudinales de cariopsis de *Triticum sativum* (A) producidas por el rociado de sus espigas con conidios de *A. parasiticus* NRRL 2999 (B, C, D) o de *F. tricinctum* NRRL 3299 (E, F, G).

*El desarrollo vegetal de las plántulas provenientes de semillas sembradas en suelos infectados con *A. parasiticus* o con *F. tricinctum* fué significativamente mayor al de las plantas crecidas en tierra estéril, no existiendo ninguna diferencia atribuible a un hongo en particular o a la inoculación de las semillas con *Streptomyces* sp.

*Observando los datos de la Tabla N° 3, podemos afirmar que aunque no se presentaron diferencias significativas en el número de espigas promedio por planta en los diferentes tratamientos, el número y el peso de los granos promedio fué superior en las plantas cultivadas en tierras infectadas.

Estos efectos podrían atribuirse al rol beneficioso desarrollado por los hongos presentes en la rizosfera. Actualmente se sabe que la rizosfera vegetal está densamente poblada por hongos y bacterias, aprovechando las excreciones radiculares que varían desde azúcares y aminoácidos, ácidos orgánicos y enzimas, vitaminas y sustancias de crecimiento e inhibición (12,13,14,15). Existe así un efecto altamente selectivo sobre los microorganismos en general y los

hongos en particular. Los hongos, a su vez movilizan nutrientes minerales hacia las plantas, aumentan la posibilidad de retirar agua del suelo, fijan nitrógeno, defienden la rizosfera por medio de antibióticos (17,18) y pueden en algunos casos incrementar la producción de hormonas de crecimiento vegetal (auxinas) (19,20).

*El efecto de rociado de las espigas con *Aspergillus* dependió de la inoculación o no con *Streptomyces* de las semillas sembradas en las macetas, mientras que el rociado con *Fusarium* no afectó la producción de granos en las plantas inoculadas o no con *Streptomyces*. Además en ninguno de los cariopsis se observó la presencia de hifas ni conidios fúngicos lo que indicaría que el hongo no penetra en las semillas, aunque las modificaciones anatómicas registradas en la Figura 2 pondrían de manifiesto tal vez un posible efecto tóxico producido por los hongos toxicogénicos.

*Teniendo en cuenta que no se presentó ataque o invasión por parte de los hongos a las plantas de trigo, no pudo determinarse si *Streptomyces* sp. C/33-6 ejerció o no una acción protectora sobre tales plantas.

REFERENCIAS

- 1.- Smith, J.E. & Ross, M.C. (1985). "Mycotoxins, formation, analysis and significance". John Wiley Sons Ed. Great Britain.
- 2.- Moss, M.O. & Frank, J.M. (1985). "Trichotecens and other mycotoxins". John Wiley and Sons Ed. Great Britain.
- 3.- Goodfellow, M. & Williams, S.S. (1983). "Ecology of Actinomycetes". Ann. Rev. Microbiol. 37: 189-216.
- 4.- Gupta, R.C. & Tandon, R.N. (1977). "Growth inhibition of fungi by volatiles from *Streptomyces*". Trans. Brit. Mycol. Soc. 68: 438-439.
- 5.- Borghi, A.L.; Fulgueira, C.L. & Bracalenti, B.J.C. de. (1988). "Inhibición de *Fusarium graminearum* por una cepa de *Streptomyces* sp.". Bol. Micol. 4: 237-242.
- 6.- Fulgueira, C.L.; Borghi, A.L. & Bracalenti, B.J.C. de. (1989). "Inhibición de *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 por una cepa de *Streptomyces* sp.". Rev. Microbiol. 20: 215-222.
- 7.- Tomaselli, L. & Florenzano, G. (1971). "Heterotrophy and nitrogen fixation in several blue green algae from soil". Zbl. Bakteriol. Paras. Infekt. Hig. 2 Abt. 126: 420-424.
- 8.- Turham, G. (1981). "A new race of *Streptomyces ochraceiscleorificus* in the biological control of some soilborne plant pathogens II. In vivo studies on the possibilities of using C/2-9 against some important diseases". J. of Plant Diseases and Protection 88: 422-434.
- 9.- Esau, K. (1982). "Anatomía de las plantas con semillas". Hemisferio Sur Ed. República Argentina.
- 10.- Fhan, A. (1985). "Anatomía vegetal". Editorial Pirámide. España.
- 11.- Strimatter, C. (1979). "Modificación de una técnica de coloración de Safranina-Fast Green". Bol. Soc. Arg. Bot. 18: 121-122.
- 12.- Daft, M. J. & Nicholson, T.H. (1969). "The effect of endogen micorrhiza on plant growth". New Phytolog. 68: 953-963.
- 13.- Darbyshire, J.F. (1972). Nitrogen fixation by *Azotobacter chroococcum* in the presence of *Colpodia steinii* I. The influence of temperature". Soil Biol. Biochem. 4: 359-369.
- 14.- Andal, R.; Bhuvanewari, K. & Subra-Rav, N.S. (1965). "Root exudation of paddy". Nature 178: 1063-1069.
- 15.- Richards, B.N. (1965). "Mycorrhiza development of lobolly pine seedlings in relation to soil reaction and the supply of nitrate". Plant & Soil 22: 187-199.
- 16.- Timonin, M.J. (1980). "The interaction of higher plants and soil microorganisms I: Microbial population of rhizosphere of seedlings of certain cultivated plants". Canad. J. Res. 18: 307-317.
- 17.- Lockhead, A. G.; Timonin, M. J. & West, P.M. (1958). "Soil bacteria and growth promoting substances". Bact. Rev. 22: 145-153.
- 18.- Primavesi, A. (1984). "Manejo ecológico del suelo". El Ateneo. Pedro García, S.A. Ed. Rep. Arg.
- 19.- Devlin, R. M. (1979). "Fisiología vegetal". Ediciones Omega S.A. España.
- 20.- Thimann, K.V. (1985). "On the plant growth hormone produced by *Rhizopus stolonatus*". J. Biol. Chem. 109: 279-281.