

*Artículo original de investigación*

## Evaluación del efecto antagonista de un consorcio bacteriano sobre *Rhizoctonia solani* Kühn en cultivos de arroz.

Luis Amaíz<sup>1,2\*</sup>, Rosmary Vargas<sup>1</sup>, Luis Medina<sup>1</sup>, Noja Izzeddin<sup>1</sup>, Oscar Valbuena<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA-UC).  
Facultad de Ciencias de la Salud (FCS-UC).

<sup>2</sup>Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT-UC).  
Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela.

\*Autor de Correspondencia: leamaiz@uc.edu.ve; afle01@hotmail.com

### Resumen

*Rhizoctonia solani* Kühn es un hongo fitopatógeno que ataca cultivos de arroz provocando disminución en el rendimiento de sus cosechas. Este trabajo evaluó el comportamiento de un consorcio bacteriano denominado “Lp” como agente biocontrolador del hongo fitopatógeno. Se determinó el efecto antifúngico de Lp frente a *R. solani* en cultivos duales *in vitro*; obteniéndose un  $62 \pm 1\%$  de inhibición de crecimiento del hongo en medio Agar Papa Dextrosa y  $58,0 \pm 0,5\%$  en agar nutritivo. El efecto antagonístico estuvo relacionado a una actividad proteolítica extracelular presentes en sobrenadantes libres de células obtenidos de Lp, lo cual se determinó por zimografía. En pruebas de germinación en condiciones de laboratorio, la aplicación de Lp estimuló el crecimiento de plántulas de arroz. Estudios de campo preliminares indican un incremento de 44% en la producción de grano de arroz en cultivos tratados con Lp. Estos resultados demuestran que este consorcio bacteriano puede ser empleado como agente biocontrolador del hongo fitopatógeno *R. solani* Kühn.

**Palabras clave:** bacterias antifúngicas, hongos fitopatógenos, control biológico, *Oriza sativa* L.

### Abstract

*R. solani* is a fungal phytopathogen that attacks rice, generating low yields in its crops. This study evaluated the behavior of a bacterial consortium (Lp) as a bio controller agent against the phytopathogen fungus. The antagonist effect, using *in vitro* Lp/*R. solani* dual cultures prepared in potato dextrose agar and nutritive broth media, reached inhibitory levels of  $62,0 \pm 1\%$  and  $58,0 \pm 0,5\%$  respectively as compared with the growth of the fungus in absence of Lp. Besides, Lp grew in a minimal mineral medium supplemented with *R. solani* as the sole carbon source. The antagonist effect was related to an extracellular proteolytic activity present in the cell free supernatants obtained from Lp, which was determined by zymography. In germination experiments, previous incubations of rice seeds during 12 h with Lp, increased the size of plantlets and roots compared to the non treated seeds. By Lp treatment of a rice paddy, at Calabozo, Venezuela, an increase of 44% (equivalent 867kg/ha) was obtained respect to a control rice field (without any treatment). The data indicated Lp consortium could be used as a biocontroller agent against *R. solani* in rice cultivation.

**Key words:** antifungal bacteria, phytopathogenic fungus, biocontrol, *Oriza sativa* L.

## 1. Introducción.

Las enfermedades en plantas producidas por microorganismos fitopatógenos tales como bacterias, protozoos, nemátodos y hongos, ocasionan pérdidas en la producción agrícola, lo cual provoca un bajo rendimiento económico para el productor. Entre los fitopatógenos, los hongos *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, constituyen grupos que atacan a los cultivos de arroz y maíz (Abreu *et al.*, 1993; Vega y Fernández 2001). En Venezuela, Edo. Guárico, específicamente en Calabozo, *R. solani* es el segundo patógeno fúngico más importante, afectando un 20% la producción agrícola de arroz. Este fitopatógeno origina diversas enfermedades, entre las que se encuentra, el añublo de la vaina, lo que ocasiona considerables pérdidas por los costos económicos que implica el control del fitopatógeno, y rendimiento de la cosecha. Una de las alternativas empleadas para minimizar y controlar la propagación del *R. solani* y aumentar la producción del cultivo es la aplicación de agroquímicos; principalmente fungicidas y fertilizantes, esparciéndose grandes cantidades de éstos por sistema de riego aéreo o terrestres sobre los cultivos afectados. Aún cuando estos agroquímicos se caracterizan por ser eficaces en el control de hongos y plagas, generan problemas ambientales debido a los elementos altamente tóxicos que los conforman y que al mismo tiempo son persistentes para su biodegradación por microorganismos del suelo (Alvarez 1997; Kasempour 2004). La disminución de estos impactos ambientales se logra empleando sistemas de control alternativos; ejemplo de ello es el uso de microorganismos como agentes biocontroladores de fitopatógenos, los cuales, actúan desplazando los agentes

infecciosos de forma natural (control biológico) y fortalecen a la especie vegetal atacada. La ventaja de emplear productos biológicos radica en que éstos usualmente no ejercen efectos nocivos al hombre y ambiente (Tarik *et al.*, 2005; Kloepper *et al.*, 1999). Además, representan una alternativa económica en el control y disminución de fitopatógenos (Montesinos *et al.*, 2002; Nandakumar *et al.*, 2002). En este sentido, se plantea evaluar el efecto de un consorcio bacteriano sobre *R. solani* en cultivos de arroz *in vitro* y su posible uso como controlador biológico del hongo

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Material biológico.

El hongo fitopatógeno *R. solani* y el consorcio bacteriano denominado Lp, éste último constituido por *Acinetobacter iwoffii*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas alcaligenes* y *Bacillus spp*; fueron suministrados por el Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas de la Universidad de Carabobo (CIMA-UC). Las semillas de arroz, variedad Cimarrón, fueron suministradas por agricultores de Calabozo, Estado Guárico, Venezuela.

### 2.2 Crecimiento de Lp en caldo nutritivo.

El consorcio bacteriano Lp se cultivó en Erlenmeyers con caldo nutritivo (CN) esterilizado a 121°C y a 1,21 Psi. Las incubaciones se efectuaron a temperatura ambiente y en condiciones aeróbicas durante un período de 24-48h. La turbidez en el medio evidenció el crecimiento de los microorganismos. Alícuotas de estos cultivos a densidades cercanas a 10<sup>7</sup> UFC/mL se emplearon para los análisis subsiguientes.

### 2.3 Crecimiento de *R. solani*.

Un esclerocio de *R. solani* se cultivó en placas Petri con agar Papa Dextrosa (PDA) suplementado con amoxiciclina 500mg/mL

de concentración final. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante siete días en oscuridad; tiempo en el cual se desarrollaron nuevos esclerocios, los cuales fueron utilizados para ensayos posteriores. En medio líquido, un esclerocio se cultivó durante cinco días con agitación constante (80rpm) en un agitador orbital Forma Scientific, en un Matraz Erlenmeyer con CN a pH 7,0, esterilizado a 121°C y 1,2 Psi, suplementado con amoxiciclina. Los esclerocios con micelios desarrollados fueron empleados para los análisis enzimáticos.

#### **2.4 Ensayos in vitro de Lp frente al hongo *R. solani*.**

Para evidenciar los posibles efectos de Lp sobre *R. solani* se procedió a establecer cultivos duales en medios sólidos y líquidos:

**2.4.1.- Cultivo dual en medio sólido (CDS):** en el centro de una placa Petri con agar nutritivo (AN) o con PDA, se colocó un esclerocio de *R. solani* previamente obtenido de los cultivos anteriormente descritos. Posteriormente, con un asa de platino impregnada con Lp se trazó una línea circular de 3cm de diámetro alrededor del esclerocio. Las placas se incubaron durante tres días a temperatura ambiente y en oscuridad, realizándose una inspección diaria para observar el crecimiento de ambos organismos. El crecimiento del fitopatógeno se comparó con un sistema control en el cual únicamente el hongo fue sembrado. El porcentaje de inhibición del hongo se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Tarik *et al.*, 2010; Meza *et al.*, 2007; Vesperman *et al.*, 2007)

$$\% \text{ inh: } [1 - (A / B)] \times 100$$

Donde A= Diámetro del halo de crecimiento del hongo enfrentado a Lp (cm)

B= Diámetro del halo de crecimiento del hongo sin enfrentar a Lp (cm).

Además, un sistema control para Lp también fue implementado. Los tres sistemas fueron crecidos a las mismas condiciones del bioensayo y por triplicado.

**2.4.2.- Cultivo dual en medio líquido (CDL):** estos ensayos realizados en matraces Erlenmeyer, por triplicado, contenían 300mL de CN previamente esterilizados a 121°C, 2mL de inóculo Lp y un esclerocio del fitopatógeno en cada sistema. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente y en agitación constante (80rpm) en un agitador orbital por siete días. Para verificar el efecto biocontrolador de Lp sobre *R. solani*, se monitorearon tres propiedades: el crecimiento de Lp, el crecimiento de *R. solani* y la inhibición de hongo por Lp. Los diseños experimentales para determinar dichos parámetros se describen a continuación (Krishnan *et al.*, 2007; Reinoso *et al.*, 2006):

**A.- Curva de crecimiento Lp:** diariamente y hasta por siete días se retiró 1mL del CDL midiéndose la absorbancia a 540nm en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys II). Como sistema control, se hizo crecer el consorcio bacteriano en ausencia del hongo fitopatógeno a las mismas condiciones. Con estos datos se elaboró un gráfico relacionando la absorbancia con el tiempo de cultivo.

**B.- Crecimiento de *R. solani*:** alícuotas de 1mL de CDL se sembraron por extensión en placas Petri con AN y PDA suplementados con amoxiciclina 500mg/L. Las placas se incubaron en oscuridad, a temperatura ambiente en condiciones aeróbicas durante siete días. La aparición de micelios indicó el crecimiento del hongo. Como sistema control, se creció el hongo en AN y en PDA en ausencia del

consorcio bacteriano a las mismas condiciones.

**C.- Inhibición del crecimiento de *R. solani* por *Lp*:** la toxicidad del sobrenadante libre de células de *Lp* sobre el hongo, se determinó de acuerdo al siguiente diseño experimental: volúmenes de 5mL del cultivo de *Lp* previamente crecidos, se centrifugaron a 10.000xg (centrifuga Thermo) y el sobrenadante obtenido se esterilizó por filtración con una membrana millipore de 0,45  $\mu$ m. Este sobrenadante libre de células se transfirió a un tubo de ensayo estéril. Seguidamente, un esclerocio del *R. solani* previamente lavado con solución salina estéril al 0,85% m/v, se adicionó al tubo de ensayo y se incubó a temperatura ambiente, en condiciones aeróbicas durante tres días. Un sistema blanco, para evidenciar la viabilidad del hongo, consistió en crecer un esclerocio en CN incubándose a las condiciones descritas.

**2.4.3.- Crecimiento de *Lp* empleando *R. solani* como única fuente de carbono:** en un Erlenmeyer conteniendo 50mL de MMM ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2M;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M;  $\text{CuSO}_4$  1% m/v;  $\text{FeSO}_4$  1% m/v;  $\text{MgSO}_4$  1% m/v;  $\text{ZnSO}_4$  1% m/v;  $\text{NaCl}$  1% m/v;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1% m/v;  $\text{CaCO}_3$  1% m/v) y *R. solani* (precrecido por 5 días como se indicó anteriormente y luego de tres lavados con agua estéril y finalmente con MMM estéril), fue inoculado con 1mL de *Lp* ( $10^7$  UFC/mL) a temperatura ambiente y en agitación constante. Luego de 72h de incubación, una alícuota (3mL) de éste cultivo se transfirió a los siguientes medios de cultivo:

**Sistema 1 (S1):** Matraz Erlenmeyer conteniendo 100mL MMM con *R. solani* como única fuente de carbono (esclerocio con micelio desarrollado) esterilizado a 121°C y 1,2 Psi.

**Sistema 2 (S2):** 100mL de MMM previamente autoclavado y posterior adición de *R. solani* (esclerocio con micelio desarrollado) no autoclavado como única fuente de carbono.

Ambos sistemas se incubaron a temperatura ambiente y en agitación constante durante siete días. El crecimiento bacteriano se verificó midiendo diariamente la absorbancia, tal como se explica en la sección 2A. Los ensayos se realizaron por triplicado; y como sistema blanco (para descartar posible contaminación bacteriana ambiental), se utilizó un sistema similar incubado en las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano (Saad 2006, Brunner *et al.*, 2005; Duffy *et al.*, 2004).

#### **2.4.4.- Detección de actividad proteolítica.**

Para identificar las enzimas proteolíticas extracelulares presentes en el medio de cultivo, se utilizó los sobrenadantes libres de células (centrifugado por 10min a 10.000 x g) proveniente de los sistemas preparados en las secciones 2A y 3(S1,S2), retirándose diariamente y hasta por siete días una alícuota de 1mL. Las muestras fueron almacenadas en un congelador (-20°C) para su posterior uso. La actividad enzimática se determinó por zimografía usando como sustrato gelatina 0,2% m/v incluida en gel de poliacrilamida 10% m/v con dodecilsulfato de sodio. La corrida electroforética se llevó a cabo por 2,5h a temperatura ambiente y 100V en un equipo Bio Rad (Saad 2006; Amaíz 2003, De Marco y Félix 2005).

#### **2.4.5.-Pruebas de germinación y crecimiento.**

Para evidenciar que el consorcio bacteriano *Lp* (agente biocontrolador) podía promover el crecimiento del arroz, se realizó una prueba de germinación y crecimiento ajustadas a condiciones de laboratorio. A tales efectos se colocaron

sobre una bandeja de plástico con suficiente agua para su mantenimiento, 25 semillas de arroz previamente incubadas (12h) con una suspensión de Lp (aprox.  $10^7$  UFC/mL) precrecido en CN por 48h. Se cubrió el sistema con una servilleta de papel y se monitoreó la germinación de los granos de arroz y su crecimiento hasta el estadio de plántula, lo cual ocurrió a los 15 días de tratamiento. Como sistema control, en una bandeja aparte, se aplicó el mismo procedimiento sin tratar previamente las semillas con Lp. Ambos ensayos se incubaron a temperatura ambiente y diariamente se observó el crecimiento. Los criterios para evaluar el efecto del tratamiento fueron porcentaje de germinación, longitud de las plántulas y raíces. Para determinar la longitud de las raíces, éstas se estiraron y se midieron con una regla.

### 3. Resultados y discusión

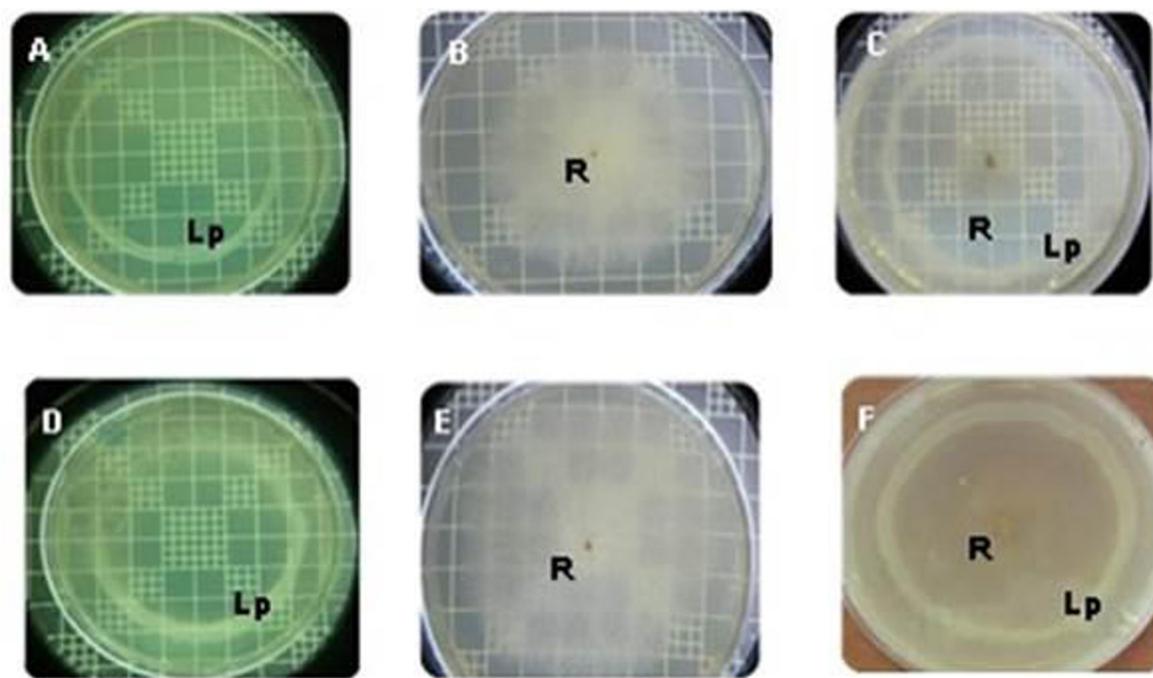
#### 3.1 Cultivos duales en medio sólidos y líquidos.

En la figura 1 se ilustra la prueba de antagonismo de Lp frente al hongo fitopatógeno en medio AN y PDA (CDS). En el bioensayo con PDA, en presencia y ausencia de Lp, los diámetros de crecimiento del hongo fueron  $2,40 \pm 0,2$  cm y  $6,0 \pm 0,3$  cm de diámetro respectivamente (figura 1C y 1B); lo que representó un  $62 \pm 1\%$  de inhibición del crecimiento del hongo, comparado con el sistema control (figura 1B). La figura 1A muestra el crecimiento de Lp en ausencia del hongo fitopatógeno, ensayo que evaluó la viabilidad de Lp. De igual manera se realizó un control negativo (blanco) con agua destilada estéril donde no se observó crecimiento. Un resultado similar fue obtenido cuando se realizó el bioensayo en AN; los diámetros de crecimiento del micelio del hongo en presencia y ausencia de Lp fueron de  $2,60 \pm$

$0,05$  cm y  $6,1 \pm 0,1$  cm respectivamente (figura 1F y 1E); indicando un  $58,0 \pm 0,5\%$  de inhibición del crecimiento comparado con el sistema control.

Estos ensayos indican que el efecto inhibitorio sobre el hongo fitopatógeno es elevado e independiente de la fuente de nutrientes utilizada. Adicionalmente, puede observarse que el hongo y las bacterias no establecieron contacto físico entre ellos, lo que podrían implicar que el efecto inhibitorio se establece por sustancias excretadas con capacidad de difusión en el medio de cultivo sólido. Vesperman et al., mostraron resultados con un porcentaje de inhibición de 20% en cultivos duales con *Pseudomonas trivialis* a las 48h de incubación y 30% de inhibición del hongo *R. solani* con *Bacillus* spp. utilizando medios PDA. Igualmente, Reinoso et al., mostraron resultados con 100% de inhibición del crecimiento del hongo *R. solani* empleando cepas bacterianas del mismo género.

El cultivo dual en medio líquido (CDL), consistió en hacer crecer el hongo fitopatógeno bajo condiciones in vitro en presencia del consorcio bacteriano en CN. En este caso, no hubo crecimiento del hongo (no se desarrolló micelio), durante los siete días de incubación, por lo que se asumió un 100% de inhibición (resultado no mostrado). Este comportamiento se puede explicar al asumir que las bacterias se duplican más rápidamente que el hongo y por lo tanto éstas consumen más rápido las fuentes de nutrientes disponibles en el medio. En el sistema control (*R. solani* sin Lp), el hongo fitopatógeno comenzó a crecer lentamente a las 24h de incubación y a los cinco días obtuvo su máximo crecimiento (esclerocio con micelio desarrollado). Lo cual demuestra la viabilidad del hongo bajo las condiciones experimentales.

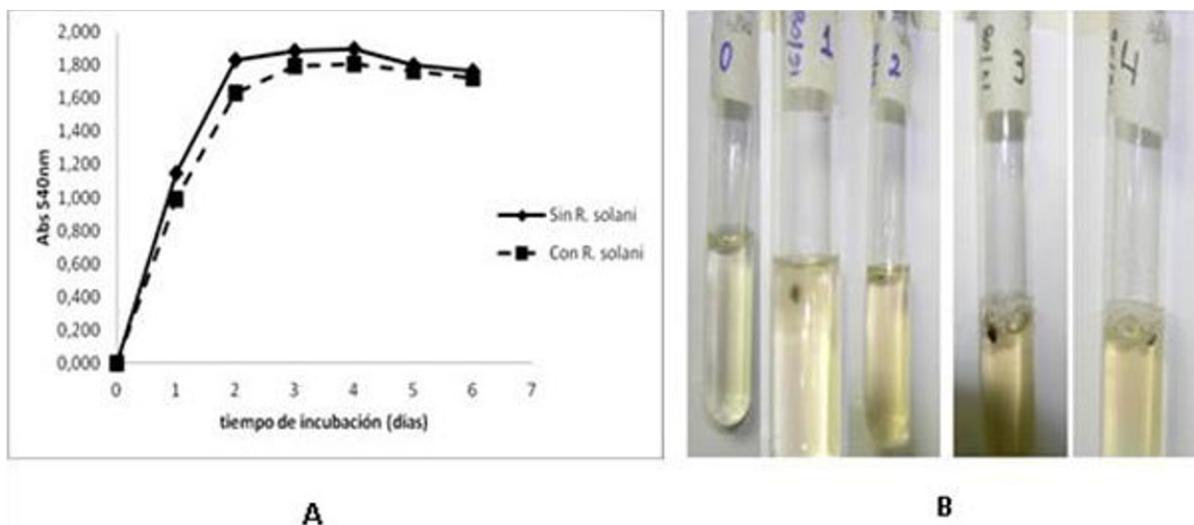


**Figura 1. Cultivos duales en medio sólido.** Medio en PDA (superior) y medio en AN (inferior). **A y D** corresponden a **Lp** solo. **B y E** corresponden a **R. solani** solo. **C y F** corresponden al cultivo dual de ambos microorganismos (**Lp + R**).

Para ambos casos (CDS y CDL), Lp mostró ser un buen antagonista contra *R. solani*, puesto que el efecto fue claramente evidenciado al obtenerse altos porcentajes de inhibición (62% y 58% para CDS; 100% para CDL). Es probable que este comportamiento sea debido a la síntesis de diversos metabolitos extracelulares con acción antifúngicas (fungistáticos, fungicidas) que afectan el crecimiento del fitopatógeno. Guerrero *et al.*, León *et al.*, Mojica *et al.*, Barea *et al.*, reportaron que las bacterias del género *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, entre otras; pueden excretar metabolitos tales como enzimas líticas, antibióticos volátiles, ejerciendo efectos negativos que debilitan hongos patógenos y los hacen más sensibles a los metabolitos solubles. Adicionalmente, estas mismas cepas pueden mostrar capacidades distintas para

inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos.

Con el fin de constatar si el fitopatógeno influía de alguna manera en el crecimiento de Lp (producción de biomasa) o si entre ellos existía competencia por los nutrientes, se midió el crecimiento de Lp en ausencia y presencia del hongo fitopatógeno en función del tiempo. En la figura 2A se puede observar que, para ambos sistemas, entre el tiempo cero y segundo día de incubación Lp alcanzó la fase exponencial de crecimiento; a partir de este tiempo se mantuvo constante hasta el séptimo día (fase estacionaria) sin entrar aparentemente en la fase de muerte. Estos resultados demuestran que el consorcio bacteriano Lp presenta un comportamiento muy similar en ambos sistemas; por lo tanto, pareciera que el sistema bacteriano no es influenciado por la presencia del hongo.



**Figura 2. Interacciones entre el consorcio bacteriano Lp y *R. solani*.** (A): Efecto del hongo sobre Lp. (B): Efecto de los sobrenadantes libres de células de Lp sobre esclerocios del hongo. **Nota:** Los números ubicados en la parte superior de los tubos de ensayo (1 al 4) indican el tiempo de incubación al cual se obtuvo el sobrenadante libre de células; 1: un día; 2: dos días; 3: tres días; 4: cuatro días. El tubo 0 corresponde a un sistema blanco (sin material biológico).

En la figura 2B se muestra la prueba de toxicidad del sobrenadante libre de células de Lp sobre *R. solani*. Se observa el crecimiento del hongo (desarrollo de micelio) a las primeras 24h de incubación, pero a partir de las 48h y hasta las 96 horas no se observó posterior crecimiento de los esclerocios. En los sistemas blancos (sin material biológico) no se detectó crecimiento, lo cual descartó la posible contaminación durante el tiempo de incubación. Los resultados obtenidos en estos ensayos sugieren que las bacterias constituyentes de Lp posiblemente sintetizan/excretan diversos metabolitos, entre ellos, enzimas líticas tales como proteasas, amilasas, glucanasas, quitinasas y celulasas o compuestos de bajo peso molecular como parte del mecanismo de acción en contra del hongo fitopatógeno (Ren *et al.*, 2006, Rodríguez *et al.*, 2006; Trujillo *et al.*, 2007).

### 3.2 Detección de actividad proteolítica.

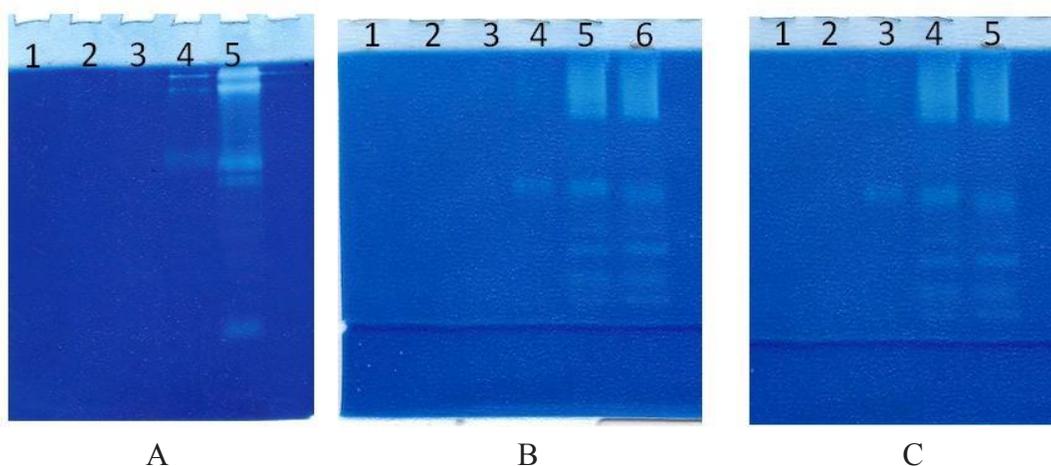
En la figura 3 se muestra los zimogramas evidenciándose la actividad proteolítica

como bandas blancas sobre un fondo azul a diferentes tiempos de incubación y en diferentes medios de cultivos (CN, S1 y S2). En medio CN (figura 3A), la actividad no fue detectada en los primeros dos días de crecimiento (carriles 2 y 3) y a partir del tercer día se detectaron tres bandas de actividad con poca intensidad; alcanzando máxima intensidad y mayor número de bandas a las 96h de incubación (carriles 4 y 5 respectivamente). Esta actividad enzimática podría relacionarse a la inhibición del crecimiento de los esclerocios observada en la figura 2B; pudiendo concluir que Lp produce enzimas proteolíticas extracelulares y tal vez otros metabolitos inhibiendo de manera parcial o total el crecimiento del fitopatógeno. Resultado similar fue obtenido al detectar actividad proteolítica en los sistemas S1 y S2 (figura 3B y 3C). Con respecto a la figura 3B, en los primeros días de incubación (carril 2, 3 y 4), se observó pocas bandas de baja intensidad, mientras que a partir del 4 y 5 días de incubación

(carriles 5 y 6) la intensidad de las mismas aumentó. En la figura 3C, hasta las 24h de incubación (carriles 1 y 2) no se observó actividad proteolítica, a las 48h (carril 3), se observó dos bandas con poca intensidad, y a las 72 y 144h (carriles 4 y 5) se observó mayor número de las mismas y con mayor intensidad; lo que indica que la presencia de estas enzimas en el medio de cultivo comienza entre las 24 y 48h de incubación, obteniéndose a las 72h la máxima expresión y manteniéndose constante hasta las 144h. Resultados de nuestro laboratorio, no detectaron actividades enzimáticas tipo amilasas y celulasas en estos sistemas.

Estos resultados experimentales demuestran que este consorcio bacteriano tiene la capacidad de controlar a *R. solani* probablemente mediante la producción y excreción de enzimas proteolíticas, las cuales son sintetizadas por las bacterias independientemente si el hongo está (S1) o no autoclavado (S2). Estas enzimas fueron

probablemente inducidas por los compuestos orgánicos provenientes del hongo, entre ellos, diferentes proteínas y particularmente compuestos que conforman las paredes celulares del hongo. Además, estas proteasas bacterianas podrían incrementar la cantidad de aminoácidos en el medio de cultivo, al efectuar la proteólisis de proteínas fúngicas, suministrando una fuente de energía y de carbono que las bacterias necesitan para potenciar su crecimiento y sintetizar moléculas bacterianas propias (26). La producción de este tipo de enzimas ha sido reportada por Dev *et al.*, al emplear *Pseudomonas fluorescences* como antagonistas de *R. solani*, y de *Phytophthora capsici* en medios de cultivos duales líquidos y con el hongo como única fuente de carbono. Igualmente, Reinoso *et al.*, reportaron enzimas tipo proteasas y quitinasas extracelulares al emplear bacterias del género *Bacillus* como antagonistas de *R. solani*.

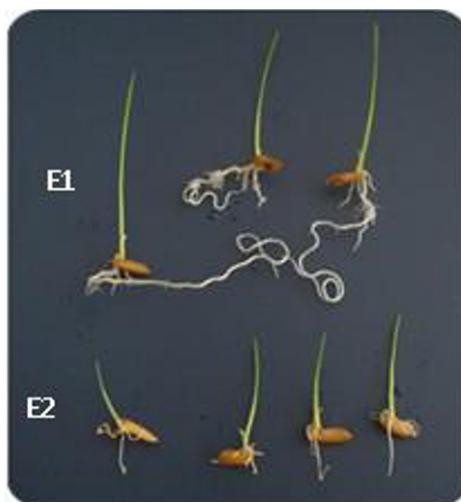


**Figura 3. Actividad proteolítica extracelular bacteriana detectada por zimografía. (A):** en caldo nutritivo y en presencia del hongo fitopatógeno con respecto al tiempo de incubación. **Nota:** Los números en la parte superior del gel indican: **1:** 0h; **2:** 24h; **3:** 48h; **4:** 72h; **5:** 96h de incubación. **(B):** en S1. **Nota:** Los números en la parte superior del gel indican: **1:** 0h; **2:** 24h; **3:** 48h; **4:** 72h; **5:** 96h; **6:** 168h de incubación. **(C):** en S2. **Nota:** Los números en la parte superior del gel indican: **1:** 0h; **2:** 24h; **3:** 48h; **4:** 72h; **5:** 144h de incubación. En cada carril se analizó 10uL de muestra libre de células.

### 3.3 Pruebas de germinación y de crecimiento.

Una vez evidenciada la capacidad de Lp en controlar o inhibir el crecimiento del fitopatógeno en condiciones de laboratorio, se realizó una prueba de germinación de las semillas y crecimiento de las plántulas para verificar si éste consorcio bacteriano podía promover o estimular algún efecto sobre el desarrollo de las plantas de arroz. La figura 4 muestra los resultados obtenidos; a los cinco días de incubación, el 96% (24/25) de las semillas de arroz germinaron, mostrando raíces y tallos incipientes; a los diez días de tratamiento se obtuvieron plántulas (E1 y E2). En las plántulas provenientes del sistema con tratamiento (E1), la longitud promedio de los tallos y raíces fue  $3,4 \pm 1,1$  cm y  $5,20 \pm 1,5$  cm respectivamente, mientras que en las semillas no sometidas a tratamiento (E2) los valores obtenidos fueron de  $2,1 \pm 0,3$  cm y  $1,0 \pm 0,4$  cm respectivamente. El cociente tallo/raíz en el control fue de 2,1 mientras que en el sistema tratado fue de 0,65; lo que indica que la raíces del

sistema tratado (E1) crecieron cinco veces más que el control (E2). Por otro lado, los tallos en E1 crecieron 1,6 veces más que en el sistema no tratado con Lp (E1). Estos resultados indican que Lp, además de, tener el potencial de inhibir el crecimiento del fitopatógeno, también posee la capacidad de promover un mejor crecimiento de las plantas de arroz en condiciones de laboratorio. Unas de las razones por las cuales estas bacterias ayudan o estimulan el crecimiento de la planta de arroz sería que las mismas pueden influir de una manera directa o indirecta sobre el metabolismo de la planta, promoviendo el aumento de la toma de agua, de nutrientes y el desarrollo del sistema radical. Al respecto, Guerrero *et al.*, Rodríguez *et al.*, y Trujillo *et al.*, reportan que Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPB) actúan por interacciones directas (planta-bacteria) o indirecta (bacteria-fitopatógeno) con la planta de interés mediante la síntesis de elementos específicos (metabolitos) no debidamente caracterizados.



**Figura 4. Prueba de germinación y crecimiento en condiciones de laboratorio. E1:** Plántulas obtenidas de semillas de arroz tratada con Lp durante 10 días. **E2:** Plántulas obtenidas de semillas de arroz sin tratamiento bacteriano.

En comunicación personal de agricultores de Calabozo, Estado Guárico, Venezuela; el tratamiento de un cultivo de arroz con Lp provocó una producción de grano de 1.970 Kg, lo cual representa un 44% (867 Kg adicionales) con respecto a la producción en una parcela sin tratamiento con Lp (1.103 Kg). Además, reportan infección esporádica de *R. solani* en las parcelas tratadas respecto a las no tratadas. Los resultados en laboratorio y pruebas de campo efectuadas por los agricultores indican que, efectivamente, Lp tiene la capacidad de actuar como agente biocontrolador de *R. solani* y que incrementa la productividad de los cultivos de arroz. Consecuentemente en futuro cercano, Lp pudiese ser aplicado en campo una vez que se haya caracterizado su efecto, el mecanismo de acción y después de haber realizado un estudio de impacto ambiental. Actualmente se continúan con las experiencias de campo para maximizar la producción de arroz.

#### 4. Conclusiones

Un consorcio bacteriano (Lp) mostró un efecto inhibitorio sobre el hongo fitopatógeno *R. solani* en medios sólidos preparados con agar papa dextrosa y agar nutritivo, alcanzando niveles de inhibición de crecimiento de  $62 \pm 1\%$  y  $58,0 \pm 0,5\%$  respectivamente. Adicionalmente, Lp excretó enzimas tipo proteasas al enfrentarse con el hongo fitopatógeno *R. solani*, incorporado a los medios de cultivo CN o MMM como fuente de carbono. Finalmente, Lp estimuló el crecimiento de las plantas del arroz en condiciones de laboratorio. Estos resultados indican que Lp pudiese ser empleado como agente biocontrolador de *R. solani* en cultivos de arroz.

Open Access: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0) which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

#### 5. Referencias

- Abreu, E., Gutiérrez, A., Fontana, H., Cartay, r., Molina, E., Kesteren, A., Guillory, M. (1993). La Agricultura. Componente básico del sistema alimentario Venezolano. Fundación Polar. Caracas-Venezuela. p 500.
- Alvarez, L. (1997). Producción de arroz en los llanos occidentales de Venezuela. Edición de la Universidad Ezequiel Zamora. Colección Docencia Universitaria. Barinas-Venezuela. pp 23-26; 170-175.
- Amaíz, L. (2003). Identificación y caracterización zimográfica de actividades tipo metaloproteasas extra-celulares de bacterias termófilas y posibles usos en tratamiento de desechos industriales. Trabajo especial de Grado para optar el título de en Química. Facyt-UC. Carabobo (Venezuela). 65 pp.
- Barea, J., Pozo, M., Azcón, R., Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56(417): 1761-1778.
- Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S., Lorito, M., Kubi, C., Mach, R. (2005). Improvement of the Fungal Biocontrol Agent to Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance. *Appl. Environ. Microb.* 71(7): 3959-3965.
- Dev, N., Dawande, A. (2010) .Biocontrol of soil borne plant pathogen

- Rhizoctonia solani* using *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas fluorescens*. Asiatic J. Biotechnol. Res. 2010 (01): 39-44.
- De Marco J., Félix, C. (2002). Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches broom disease. MC Biochem. 3: 1-7.
- Duffy, B., Keel, C., Défago, G. (2004). Potential Role of Pathogen Signaling in Multitrophic Plant-Microbe Interactions Involved in Disease Protection. Appl. Environ. Microb. 70(3): 1836-1842.
- Guerrero, Y., Rodríguez, A., Rodríguez, N., Del Valle, M., Lauzardo, A. (2011). Perspectivas del uso de bacterias rizosféricas en el control de *Pyricularia grisea* (Cooke Sacc.) en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Rev. Colomb. Biotecnol. 13(1): 16-22.
- Kazempour, M. (2004). Biological Control of *Rhizoctonia solani*, the Casual Agent of Rice Sheath Blight by Antagonistic Bacteria in Greenhouse and Field Conditions. Plant Pathol. J. 3(2): 88-96.
- Kloepper, J., Ubana, R., Zehnder, G., Murphy, J., Sikora, E., Fernández, C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potencial extensión to systemic and foliar diseases. Plant Aust. Plant Pathol. 28: 21-26.
- Krishnan, H., Kang, B., Krishnan, A., Kim, K., Kim, Y. (2007). *Rhizobium etli* USDA9032 Engineered to Produce a Phenazine Antibiotic Inhibits the Growth Fungal Pathogens but is Impaired in Symbiotic Performance. Appl. Environ. Microb. 73(1): 327-330.
- León, M., Yaryura, R., Montecchia, M., Hernández, A., Correa, O., Pacheu, N., Kerber, N., García, A. (2009). Antifungal Activity of Selected Indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the Soybean Rhizosphere. Int. J. Microb. 2009: 1-9.
- Meza, A., Esqueda, M., Gardea, A., Tiznado, M., Calleros, G. (2007). Variabilidad morfológica, patogénica y susceptibilidad a Fungicidas de *Rhizoctonia solani* aislado de rizósfera de *Vitis Vinifera* Var. Perlette sedles. Rev. Mex. Mic. 24: 1-7.
- Mojica, M., Luna, HA., Sandoval, CF., Pereyra, B., Morales, LH., González, NA., Hernández; CE., Alvarado, OG. (2009). Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. PHYTON. Rev. Int. Bot. Exp. 78:105-110.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Frances, J., Alemany, J., Llorente, I., Moragrega, C. (2002). Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. Int. Microbiol. 5: 169-175.
- Nagórska, K., Bikowski, M., Obuchowski, M. (2007). Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. Acta Biochem. Pol. 54(3): 495-508.
- Nandakumar, R., Babu, S., Radjacommare, R., Raguchander, T., Samiyappan, R. (2002). *Pseudomonas fluorescens* mediated antifungal activity against *Rhizoctonia solani* causing sheath

- blight in rice. *Phytopathol. Mediter.* 41: 109-119.
- Pal, K., Gardener, B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instruc.* pp: 1-25.
- Preston, G. (2004). Plant perceptions of plant growth-promoting Pseudomonas. *The Royal Society.* 359: 907-918.
- Reinoso, Y., Vaillant, D., Casadesús, V., García e. (2006). Caracterización e Identificación de cepas de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* aisladas del suelo con potencialidades para el control biológico de *Rhizoctonia solani* Kühn. Universidad de la Habana. Instituto de investigaciones de Sanidad Vegetal, Cuba. pp 1-6.
- Ren, H., Gu, G., Long, J., Yin, Q., Wu, T., Song, T., Zhang, S., Chen, Z., Dong, H. (2006). Combinative effects of a bacterial type-III effector and a biocontrol bacterium on rice growth and disease resistance. *J. Biosci.* 31(5): 617-627.
- Rodríguez, A., Pérez, M., Del Valle, M., Lauzardo, A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Rev. Mex. Fitop.* 24 (1): 42-49.
- Saad, M. (2006). Destruction of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici* Causing Tomato Root-rot by *Pseudomonas fluorescences* Lytic Enzymes. *Res. J. Agricult. Biol. Sci.* 2(6): 274-281.
- Tarik, M., Sumera, Y., Fauzia, H. (2010). Biological control of potato black scurf by rhizosphere associated bacteria. *Braz. J. Microb.* 41: 439-451.
- Trujillo, I., Díaz, A., Hernández, A., Heydrich, M. (2007). Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y del maíz. *Rev. Prot. Veg.* 22(1): 41-46.
- Vega, L., Fernández, O. (2001). Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios no-sanitarios. 62: 96-101.
- Vespermann, A., Kai, M., Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial Volatiles Affect the Growth of Fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microb.* 73(17): 5639-5641.