

EFFECTO Y CARACTERISTICAS DE ALGUNOS AISLAMIENTOS DE RIZOBACTERIAS FLUORESCENTES EN GENOTIPOS DE YUCA (*Manihot esculenta* Crantz)

José Hernandez M. *
J. Carlos Lozano T. **

COMPENDIO

Cepas seleccionadas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, aisladas de la rizosfera de la yuca cultivada en diferentes regiones de Colombia, causaron incrementos estadísticamente significativos en peso fresco y sanidad de las raíces cuando las plántulas o estacas se inocularon antes de la siembra, a diferentes concentraciones e intervalos de aplicación. La inmersión de raíces de clones susceptibles en suspensiones bacteriales antes del almacenamiento, redujo considerablemente el deterioro microbial y el crecimiento superficial de hongos que normalmente ocurren al almacenar las raíces de yuca. Cepas seleccionadas de las rizobacterias fluorescentes, causaron antibiosis *in vitro* en forma significativa contra bacterias causantes de pudriciones radicales, como *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*. Con base en las pruebas de caracterización, los aislamientos fluorescentes seleccionados se situaron taxonómicamente en *P. putida* (aislamientos F-44; F-64; F-61; F-71; F-56) y *P. fluorescens* (aislamiento F-87).

ABSTRACT

Selected strains of *Pseudomonas* spp. fluorescentes, isolated from the rhizosphere of cassava plants growing in different regions of Colombia, produced statistically significant increases in root fresh weight and health (decreases in the incidence of root rots) when seedlings or hardwood cuttings (stakes) were inoculated before planting, at different concentrations and intervals of application. Inoculation of roots of susceptible clones of cassava by immersion in bacterial suspensions before storage, considerably reduced the microbial deterioration and external growth of fungi which normally occur on storing cassava roots. *In vitro* antibiosis, caused by selected strains of the fluorescent rhizobacteria, was observed against various bacterial pathogens which cause rots, for example *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*. The selected fluorescent isolates were characterized taxonomically as *P. putida* (isolates F-44; F-64; F-61; F-71; F-56) and *P. fluorescens* (isolate F-87).

* Estudiante de pre-grado. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

** Centro Internacional de Agricultura Tropical- CIAT. A. A. 6713, Cali, Colombia.

1. INTRODUCCION

La yuca, *Manihot esculenta* Crantz, se usa ampliamente en la alimentación humana del trópico (Kay, 17) y en la alimentación animal se emplea como sustituto de los cereales en las raciones compuestas (CIAT, 9).

El aumento de la población en el mundo y la escasez de otras fuentes energéticas nutricionales, ha hecho que el cultivo de la yuca aumente en forma considerable (CIAT, 9); sin embargo, los precios en el mercado son altos posiblemente por los bajos rendimientos como consecuencia, entre otros, del ataque de patógenos y de plagas.

Entre los problemas patológicos más comunes e importantes del cultivo se encuentran las pudriciones radicales de precosecha, ocasionados por diferentes agentes fungosos y bacteriales (Booth, 4). A veces, las pudriciones radicales están asociadas a suelos mal drenados, excesiva precipitación pluvial, clones susceptibles, alto contenido de materia orgánica en el suelo, cultivo de especies susceptibles o tolerantes a ciertos patógenos antes de la yuca (Booth, 4; Lozano y Booth, 24; Lozano et al, 25).

Hongos o bacterias pueden causar deterioro radical durante el cultivo o durante el almacenamiento (Lozano y Booth, 24). Entre los patógenos causantes de pudriciones radicales de precosecha se encuentran especies de *Phytophthora*, *Fomes*, *Rosellinia*, *Sclerotium* y *Erwinia* (Booth, 4; Lozano y Booth, 24). El deterioro durante el almacenamiento lo pueden causar infinidad de microorganismos y parece estar relacionado con la susceptibilidad del cultivar y con los daños que sufren las raíces durante la cosecha (Toro y Atlee, 35; Wheatley, 41). Teóricamente se podría controlar la población microbial de la rizosfera favoreciendo poblaciones de microorganismos benéficos, la cual disminuiría los problemas patológicos y favorecería el crecimiento del sistema radical y por ende los rendimientos de las especies cultivadas (Schroth y Hancock, 30).

Aunque muchos grupos de microorganismos se han registrado como agentes bióticos en el control de enfermedades en plantas (Baker y Cook, 1; Broadbent y Baker, 5; Hubbard, Horman y Hadon, 16; Liu y Baker, 22; Russell y Russell, 29; Toussoun, 36; Uekhede y Rahe, 39), el de las pseudomonas fluorescentes parece ser el más promisorio por su versatilidad nutricional, habilidad para crecer bajo gran cantidad de condiciones ambientales y agresividad en la colonización del sistema radical de muchas especies de plantas (Booth, Schroth y Suslow, 8; Hubbard, Horman y Hadon, 16; Kloepper, Schroth y Miller, 20). El grupo de los pseudomonas fluorescentes está formado por *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. aeuroginosa*, siendo

las dos primeras las más estudiadas (Schroth y Hancock, 30).

El uso de *Pseudomonas fluorescentes* ha aumentado el rendimiento de algunos cultivos, promovido el crecimiento y reducido ciertas enfermedades radicales (Hubbard, Horman y Hadon, 16; Suslow y Schroth, 33; Toussoun, 36). En ensayos de campo, al inocular semillas con aislamientos seleccionados de *P. fluorescens* de la rizosfera de cultivos de remolacha, se lograron incrementos significativos en la producción de sacarosa; en el invernadero se alcanzaron incrementos del 20 al 85 o/o de peso seco y fresco de raíces y de retoños de las plántulas inoculadas (Suslow y Schroth, 33). La inoculación de una cepa de *P. fluorescens* a semillas de trigo, reduce el "take-all" de la raíz causado por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Weller, 40). Otras enfermedades radicales causadas por especies de *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Phytophthora* se han controlado con la aplicación de *Pseudomonas* spp (Howell y Stipanovic, 15; Liu y Baker, 22; Toussoun, 36; Tronsmo e Ystaas, 37). Dos cepas de *P. fluorescens*, aisladas de la peridermis de tubérculos de papa y de raíces de apio, incrementaron significativamente el crecimiento de la papa, llegando hasta un incremento del 86 o/o en pruebas de invernadero (Klopper, Schroth y Miller, 20). Al inocular dos cepas de *P. fluorescens* y *P. putida*, que exhibieron antibiosis in vitro contra *E. carotovora* pv. *carotovora*, se obtuvieron incrementos hasta el 100 o/o en peso fresco del sistema radicular de plantas de papa (Booth, Schroth y Suslow, 8).

La hipótesis más aceptada para explicar la promoción del crecimiento de las plantas por las rizobacterias, lo atribuye a un desplazamiento o exclusión de los componentes deteriorantes de la microflora alrededor de la raíz, como consecuencia de la agresiva colonización de los microorganismos benéficos. Otras hipótesis lo atribuyen a la producción de sustancias promotoras de crecimiento, tales como auxinas o quininas (Brown, 6; Merrimon et al, 27), a la capacidad de algunas de estas rizobacterias para atrapar el hierro, (Schroth y Hancock, 30), privando de este elemento a hongos y bacterias patógenos que lo necesitan (Brown y Beringer, 7; Geels y Schippers, 13; 34).

De todas maneras, existe gran esperanza sobre la actividad de estos microorganismos en el control biológico de agentes patógenos de las plantas. Como en yuca no existe investigación al respecto, el presente ensayo se dirigió al control de las pudriciones radicales de pre cosecha y de post-cosecha por el uso de rizobacterias fluorescentes.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1. Aislamientos de rizobacterias fluorescentes.

En cultivos de yuca, de diferentes estados de crecimiento, localizados en Caicedonia, Carimagua, Mondomo, Palmira y Popayán se tomaron muestras de raíces recién cosechadas.

Segmentos de raicillas, de aproximadamente 5 g de peso, lavadas en agua corriente y agitadas durante 15 minutos en 100 ml de agua destilada, se sembraron en el medio King B KB (peptona 2 o/o; glicerol 1 o/o; agar 1.5 o/o; di-potasio hidrógeno-fosfato anhidro puro 0.15 o/o; sulfato de magnesio 0.15 o/o; pH 7.2 o/o; esterilización en autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión y 121°), específico para la producción de pigmento fluorescente bajo luz ultravioleta por las especies de pseudomonas fluorescentes (King, Word y Roney, 18).

Las cajas de Petri sembradas se colocaron en cámaras de crecimiento por 24 horas a 27°C y se purificaron los crecimientos bacteriales fluorescentes.

2.2. Efectos de la inoculación con pseudomonas fluorescentes en *Manihot esculenta*.

Es un experimento diseñado completamente al azar, se inocularon con cada cepa pura grupos de 10 plántulas de *M. esculenta* CM 523, enraizadas en agua estéril según el método de propagación rápida de yuca (Cock et al, 10). A suspensiones acuosas de la bacteria, cultivada sobre KB durante 24 horas a 28°C, se les ajustó su densidad óptica a 0.5 (espectrofotómetro Baush & Lomb 20 a 600 nm de longitud de onda), con el fin de obtener una concentración aproximada de 1.1×10^9 células por mililitro para cada inóculo.

Plántulas enraizadas de igual tamaño y edad se sumergieron en el inóculo durante 15 minutos y se sembraron en potes de icopor (7.5 cm de diámetro x 9 cm de altura) con suelo esterilizado en autoclave (120°C y a 15 libras de presión por 30 minutos). Las plántulas inoculadas se mantuvieron en invernadero a 24°C (9°C), 70 o/o humedad relativa y 15 000 Lux por 12 horas de fotoperíodo promedio diario; se regaron diariamente con agua destilada estéril hasta la cosecha (dos meses después de la siembra). Los testigos se sumergieron durante 15 minutos en agua destilada estéril.

2.3. Inhibición in vitro.

Inicialmente, el efecto inhibitor de los aislamientos de pseudomonas fluorescentes sólo se probó en la especie patógena a yuca *E. carotovora* p.v. *carotovora* (Ecc). Una suspensión de aproximadamente 9×10^9 células de Ecc. por mililitro se sembró sobre KB y se incubó por 6 horas a 28°C, an-

tes de sembrar los diferentes aislamientos de pseudomonas fluorescentes que infestaban a trozos circulares de papel filtro (5 mm de diámetro por 1 mm de grosor). Se usaron aproximadamente 6 trozos por cada caja de Petri, replicándose dos veces la siembra por aislamiento probado. Se midió el halo de inhibición (mm) formado por el efecto de la cepa de las pseudomonas fluorescentes sobre Ecc después de 24 horas de incubación a 28°C. Posteriormente, se probó el efecto inhibitorio de las cepas de pseudomonas fluorescentes sobre las siguientes bacterias patógenas: *Xanthomas campestris* pv. *cassavae*; *P. solanacearum*; *X. campestris* pv. *oryzae*; *X. campestris* pv. *manihotis* y *Pseudomonas* sp., agente causal de la mancha parda bacterial en arroz (Booth, Schroth y Suslow, 8; Geels y Schippers, 13; Suslow y Schroth, 33).

2.4. Métodos de inoculación.

La cepa F-44, seleccionada por haber inducido un aumento significativo en el desarrollo del sistema radical del clon CM 523-7, se usó para determinar el método de inoculación más adecuado para promover el desarrollo radical de plántulas y estacas de yuca. Los métodos usados se refieren a inoculaciones: a) Las estacas; b) el suelo y c) plántulas. Las estacas se sumergieron en el inóculo (1.1×10^9 células/ml) durante 15 minutos y al suelo se vertieron 20 ml de inóculo por planta. Las estacas y las plantas se sembraron en suelo estéril y se mantuvieron en las condiciones de invernadero antes descritas. Los testigos se trataron con agua destilada estéril y las evaluaciones se realizaron a los dos y tres meses después de la siembra.

2.5. Concentración del inóculo.

Con suspensiones bacteriales correspondientes a 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 y 0.7 de densidad óptica se inocularon estacas del clon CM 523-7. Las plantas se mantuvieron en invernadero y dos meses después se determinó el peso de la parte aérea y de las raíces.

2.6. Efecto de la frecuencia de la inoculación.

Se inocularon diez estacas por tratamiento del clon CM 523-7, con una concentración de 1.1×10^9 células/ml en las siguientes épocas: al momento de la siembra; al momento de la siembra y a los 15 días después; al momento de la siembra y a los 15 y 30 días después; al suelo al momento de la siembra; al suelo y a los 15 días después; al suelo a los 15 y a los 30 días después; al suelo y a los 30 días después de la siembra. La evaluación se realizó a los dos meses de la siembra.

2.7. Prevención del deterioro microbioal de raíces de yuca.

Las raíces de yuca se deterioran al cabo de 72 horas de almacenamiento después de la cosecha, volviéndose inaceptables para el consumo humano y animal, al igual que para uso industrial (Wheatley, 41). Con el fin de evitar el deterioro, se sumergieron durante 15 minutos raíces del clon susceptible CMC 40 de 14 meses en suspensiones (1.1×10^9 células/ml) de los aislamientos F-61 y F-64. Las raíces inoculadas se empacaron en bolsas plásticas selladas; se inocularon 5 kilogramos de raíces por aislamiento y tiempos de almacenamiento (8 y 15 días a 28°C). Las evaluaciones del deterioro microbioal y fisiológico se hicieron según el método de Wheatley (41).

2.8. Caracterización de las especies bacteriales fluorescentes.

2.8.1. Caracteres morfológicos.

Con un microscopio de disección con luz difusa se describieron las características de las colonias (tamaño, forma, elevación y pigmentación) en los medios KB, PDA y AN después de 24 horas de incubación a 28°C (Blair, Lennette y Truant, 3; King, Word y Roney, 18; SAB, 31). La forma celular y la flagelación se observaron bajo el microscopio de luz (Zeiss) y electrónico (Jeol 100 SX) a diferentes magnificaciones. Para las observaciones bajo el microscopio de luz se utilizaron placas teñidas según el método de Leifson (32). Para el microscopio electrónico se usaron células de 24 horas de edad suspendidas por 6 horas en agua destilada estéril; las células que flotaban sobre los primeros 5 cm de la superficie de la suspensión, se colocaron sobre rejillas de 300 orificios/pulgada cuadrada, reforzadas con carbón. Estas se tiñeron con ácido fosfotungstico (PTA) al 2 o/o, pH 7.0, como medio de contraste, antes de ser observadas.

2.8.2. Pruebas fisiológicas y bioquímicas.

En cultivos frescos (18 a 30 horas), crecidos sobre agar nutriente (AN) y King B, de las cepas F-44, F-56, F-61, F-64, F-71 y F-86 se realizaron las siguientes pruebas fisiológicas y bioquímicas: tinción de Gram (González, 14; Llanos y Sánchez, 26; Twite, 38), prueba de oxidasa (Blair, Lennette y Truant, 3; Kiraly et al, 19; SAB, 31), prueba de catalasa, hidrólisis de gelatina (Blair, Lennette y Truant, 3; SAB, 31), reducción de nitratos (Blair, Lennette y Truant, 3; Kiraly et al, 19; Lelliot, Billing, Hayward, 21), pudrición blanda de la papa (SAB, 31), hidrólisis de arginina (SAB, 31; Twite, 38), producción de indol (Blair, Lennette y Truant, 3; Kiraly et al, 19; SAB, 31), litmus de leche (Blair, Lennette y Truant, 3; Kiraly et al, 19), acidificación de glucosa (SAB, 31; SAB, 32), prueba de coagulasa (SAB, 31), crecimiento a 41°C (SAB, 31) y prueba de movilidad (Blair, Lennette y Truant, 3; SAB, 31; Twite, 38).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Aislamientos.

De 136 aislamientos del grupo *pseudomonas fluorescentes* de raíces de yuca, 46 (34 o/o) inhibieron *in vitro* a *Ecc* 24 horas después de la inoculación. De las seis regiones muestreadas, en Caicedonia se encontró mayor número de cepas inhibidoras de *Ecc*; favorecidas posiblemente por las condiciones edáficas. Además, como *Ecc* causa serias epifitias al cultivo en la región (Lozano y Bellotti, 23), la evolución de estos dos organismos pudo haber ocurrido simultáneamente.

El efecto inhibitorio también se ejerció en forma significativa contra varios patógenos bacteriales de plantas; sin embargo, este efecto fue variable (Cuadro 1). Los aislamientos F-44 y F-64 mostraron mayor inhibición a las especies patógenas usadas; lo que podría indicar cierta especificidad en la inhibición a los patógenos presentes en la rizosfera. Sería lógico suponer, entonces, que las cepas con más amplio rango de inhibición, más eficientemente podrían evitar las pudriciones radicales. Los resultados estarían de acuerdo con los estudios realizados por Weller (40) en trigo y con los de Howell y Stipanovic (15), quienes redujeron la muerte de plántulas en los semilleros de algodón (causada por *Rhizoctonia solani*) con la aplicación de suspensiones de *pseudomonas fluorescentes*.

3.2. Efecto sobre *Manihot esculenta*.

De acuerdo al efecto causado a *M. esculenta*, clon 523-7, se establecieron cuatro grupos de cepas de *pseudomonas fluorescentes*: 1) cepas cuya reacción fue significativamente negativa con respecto a los controles y con relación al peso total de las plantas, peso de la parte aérea y peso radical; 2) cepas cuya reacción fue significativamente positiva con respecto al peso de la parte aérea: este grupo indujo mejor desarrollo de las plantas inoculadas mostrando un vigor mayor que el de los controles; 3) cepas cuya reacción fue significativamente positiva respecto al peso radical y 4) cepas cuyo peso aéreo y radical fue significativamente superior a los controles (Fig. 1). Esto indica que cepas del grupo bacteriano fluorescente pueden ejercer un significativo incremento en la producción de follaje y de raíces de las plantas de yuca inoculada. Los resultados concuerdan con los de Suslow y Schroth (33), quienes en condiciones de invernadero inocularon la remolacha (*Beta vulgaris*) y lograron incrementos del peso fresco de raíces entre el 20 y el 85 o/o. Incrementos similares en crecimiento y rendimiento se registraron al inocular los tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) con suspensiones bacteriales de *pseudomonas fluorescentes* (Booth, Scroth y Suslow, 8; Kloe-

Cuadro 1

Antibiosis in vitro entre seis aislamientos de pseudomonas fluorescentes y seis patógenos bacteriales de diferentes cultivos

Patógenos bacteriales	Aislamientos de pseudomonas fluorescentes					
	F -44	F -64	F-61	F-71	F-56	F-87
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> (cepa CIAT- 111)	+++*	++	++	++	++	++
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cassavae</i> (cepa CIAT-1148)	+++	+++	++	++	++	++
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> (cepa CIAT-1186)	+++	+++	++	+++	++	++
<i>Pseudomonas solanacearum</i> (cepa CIAT-1057)	++	++	++	++	++	++
<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> (cepa CIAT-1144)	+++	++	++	+	++	+
<i>Pseudomonas</i> sp., agente causal de la mancha parda bacterial en arroz (cepa CIAT- 1187)	++	+++	+++	++	++	++

* Promedio de cinco repeticiones por aislamientos de pseudomonas fluorescentes contra la respectiva especie patógena bacterial :
+ = halo inhibitorio inferior a 5 mm; ++ = halo inhibitorio entre 5 y 10 mm; +++ = halo inhibitorio mayor de 10 mm.

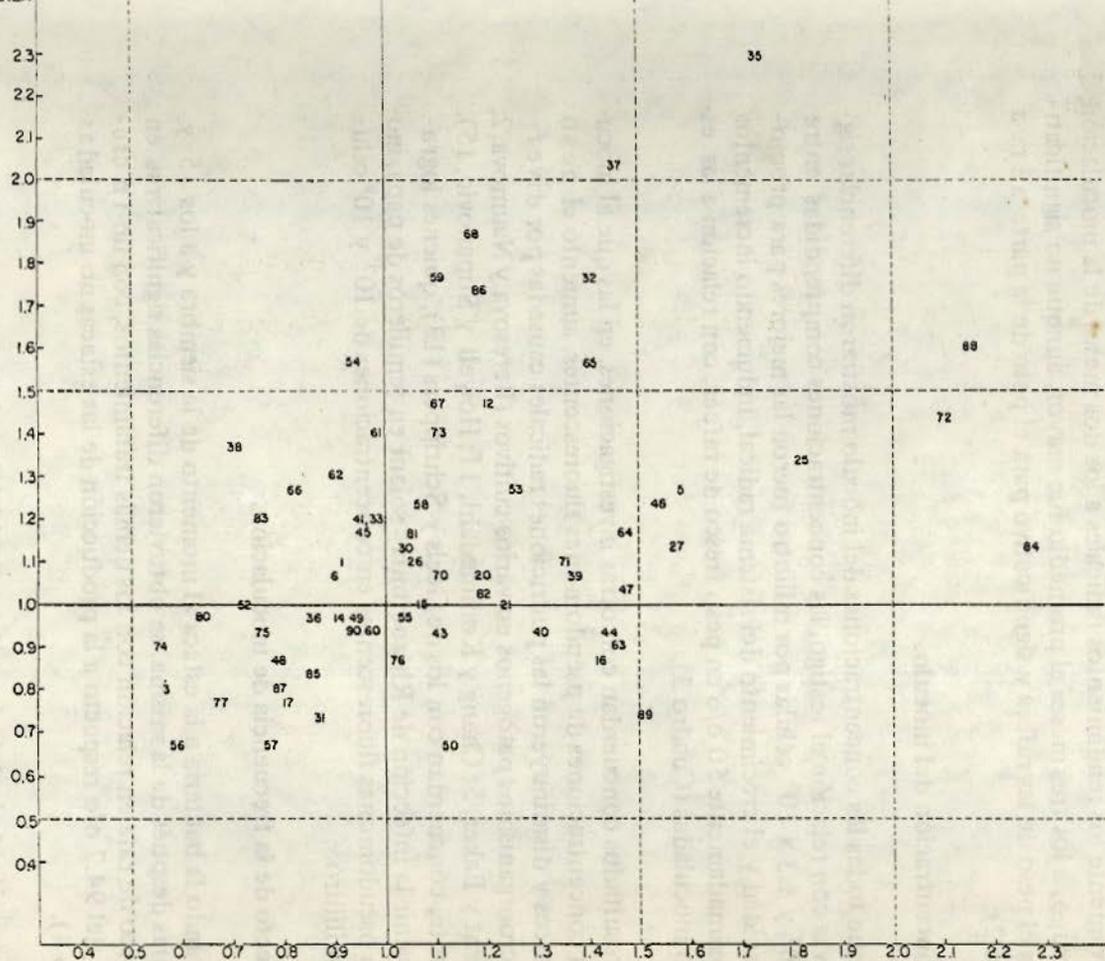


Fig. 1. Distribución de los aislamientos fluorescentes según la razón con el testigo.

pper, Schroth y Miller, 20).

3.3. Métodos de inoculación.

Aún cuando la inoculación del material de siembra (estacas y plántulas) aumentó la producción de raíces, sólo la aplicación al suelo incrementó significativamente los rendimientos radicales a los dos meses de la inoculación; sin embargo, a los tres meses el promedio fue mayor, aunque no significativo, para el peso de las raíces y significativo para el peso de la parte aérea (Cuadro 2).

3.4. Concentración del inóculo.

Aunque todas las concentraciones del inóculo mostraron diferencias significativas con relación al testigo, las concentraciones comprendidas entre 8.2×10^8 y 1.3×10^9 células por mililitro fueron las mejores para promover la sanidad y el crecimiento del sistema radical, induciendo incrementos de aproximadamente 50 o/o en peso fresco de raíces, con relación a las estacas no inoculadas (Cuadro 3).

Los resultados concuerdan con otras investigaciones, en las que al inocular altas concentraciones de pseudomonas fluorescentes, aumentó el peso de las raíces y disminuyeron las pudriciones radicales causadas por diversos microorganismos patógenos en varios cultivos (Beresova y Naumova, 2; Broadbent y Baker, 5; Chang y Kommedahl, 11; Howell y Stipanovic, 15). Igualmente, concuerdan con los de Geels y Schrippers (13), quienes lograron prevenir la infección de *Rhizoctonia solani* en semilleros de papa, inoculando pseudomonas fluorescentes en concentraciones de 10^7 y 10^9 células por mililitro.

3.5. Efecto de la frecuencia de inoculación.

Aplicando la bacteria a la estaca al momento de la siembra y a los 15 y los 30 días después de la misma, se obtuvieron diferencias significativas en peso fresco de raíz en relación con los demás tratamientos, con un incremento del 94.7 o/o respecto a la producción de las estacas no inoculadas (Cuadro 4).

3.6. Prevención de la deterioración microbial de raíces de yuca.

Al inocular la cepa F-64 de *P. putida* se redujo considerablemente el deterioro microbial y el crecimiento superficial de micelios de hongos, después de 15 días de almacenamiento de raíces de yuca en bolsas plásticas

Cuadro 2

Peso de la raíz y de la parte aérea de plantas de yuca, clon CM 523-7, después de dos y tres meses de inoculadas con una suspensión bacterial de 1.1×10^9 células por mililitro del aislamiento F-44 de Pseudomonas putida

Inoculaciones**	Peso de raíces (g)*		Peso de la parte aérea *	
	a los dos meses	a los tres meses	a los dos meses	a los tres meses
A las estacas	5.84 b*** (8.2)****	8.48 a (11.6)****	8.73 a	10.41 a
Al suelo	8.49 a (57.3)	9.37 a (23.3)	9.20 a	9.24 ab
A plántulas	5.60 b (3.7)	7.90 a (3.9)	9.80 a	8.0 b
Testigo	5.40 b	7.60 a	9.28 a	7.38 b

* Promedio de 10 plantas por sistema de inoculación.

** La inoculación al suelo sólo se hizo a los 15 días de la siembra de las estacas; se usó una suspensión bacterial con igual concentración al inóculo durante 15 minutos antes de la siembra.

*** Medias con letras iguales no difieren significativamente, según la prueba de rango múltiple de Duncan.

**** Incremento en porcentaje con respecto al testigo.

Cuadro 3

Peso del sistema radical y de la parte aérea de plantas de yuca, clon CM 523-7, a los dos meses de inoculadas con diferentes concentraciones del aislamiento F-44 de Pseudomonas putida

Concentración** (No. células/ml)	P e s o (g)*	
	Raíz	Parte aérea
1.0 x 10 ⁷	6.28 a (46.4)***	12.20 a
2.8 x 10 ⁸	6.05 a (41.1)	10.65 a
8.2 x 10 ⁸	6.36 a (48.2)	11.90 a
1.1 x 10 ⁹	6.38 a (48.8)	12.59 a
1.3 x 10 ⁹	6.45 a (50.3)	11.62 a
Testigo	4.29 b	9.84 a

* Promedio de 10 estacas inoculadas. Medias con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de rango múltiple de Duncan.

** Las estacas se inocularon antes de la siembra por inmersión durante 15 minutos.

*** Incremento en porcentaje con respecto al testigo.

Cuadro 4

Peso de raíz y peso de la parte aérea de plantas de yuca, clon CM 523-7, inoculadas con una suspensión bacterial de 1.1×10^9 células/ml del aislamiento F-44 de *Pseudomonas putida*, a los dos meses de la inoculación

Tratamientos * (Inoculaciones)	Peso (g)**	
	Raíz	Parte aérea
A la estaca al momento de la siembra	6.14 b (28.9)***	12.58 a
A la estaca al momento de la siembra y a los 15 días	7.06 ab(48.3)	12.64 a
A la estaca al momento de la siembra y a los 15 y 30 días	9.27 a (94.7)	12.27 a
Al suelo al momento de la siembra	4.98 b (4.6)	11.43 a
Al suelo y a los 15 días	6.12 b (28.5)	12.22 a
Al suelo y a los 15 y 30 días	5.32 b (11.7)	8.07 ab
Al suelo y a los 30 días	5.14 b (7.9)	6.82 b
Testigo	4.76 b	10.74 ab

* La inoculación se hizo por inmersión de estacas por 15 minutos antes de la siembra y vertiendo el inóculo a diferentes períodos sobre el suelo, alrededor de la estaca.

** Promedio de 10 plantas por tratamiento. Medias con letras iguales no difieren significativamente, según la prueba de rango múltiple de Duncan.

*** Incremento en porcentaje con respecto al testigo.

(Fig. 2). Esta cepa había inducido una clara zona de inhibición de crecimiento a los patógenos probados *in vitro* y el resultado corrobora el efecto inhibitor que poseen algunas cepas de este grupo de rizobacterias.

3.7. Caracterización de los aislamientos fluorescentes seleccionados.

3.7.1. Caracteres morfológicos.

Los aislamientos mostraron uniformidad en las características culturales en medio sólido de agar nutriente. Las colonias fueron circulares, de color blanco-crema, elevación convexa-levantada, margen entero-ondulado y de 2 a 2.5 mm de diámetro. Sobre el medio King B, las colonias fueron fluidas y con pigmentación verde-fluorescente bajo luz ultravioleta. Bajo el microscopio electrónico se observaron células alargadas de 2.0 por 0.7 a las 24 horas de edad, tenían de uno a varios (hasta 10) flagelos polares. Bajo el microscopio de luz las células eran móviles, solas o formando cadenas de hasta cinco células.

3.7.2. Características bioquímicas y fisiológicas.

El Cuadro 5 resume los resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas obtenidos con las seis cepas seleccionadas.

3.7.3. Relación taxonómica del organismo.

Por las características de los cultivos bacteriales que promovieron el crecimiento en plantas y mostraron antibiosis *in vitro* ante varios patógenos, este grupo de bacterias se puede situar en el género *Pseudomonas* (SAB, 32).

Las pruebas adicionales de caracterización, se compararon con las observadas para las especies del género *Pseudomonas*, grupo fluorescente registrado en el manual de Bergey (12). Por los resultados obtenidos sobre la hidrólisis de la gelatina y la similitud de las características observadas se puede deducir que los aislamientos 1 (F-64), 2 (F-56), 3 (F-61), 4 (F-64) y 5 (F-61) pertenecen a la especie *P. putida* y el aislamiento 6 (F-87) a *P. fluorescens*.

Aunque sólo se determinaron seis de los 136 aislamientos, los resultados sugieren que las especies *P. putida* y *P. fluorescens* son las más comunes en la rizosfera de la yuca, lo cual concuerda con los registros sobre otros cultivos en zonas templadas (8, 15, 30, 33, 40), pero exige estudios que establezcan el *status* ecológico del grupo de *pseudomonas* fluorescentes en el trópico y su efecto específico sobre *M. esculenta*.

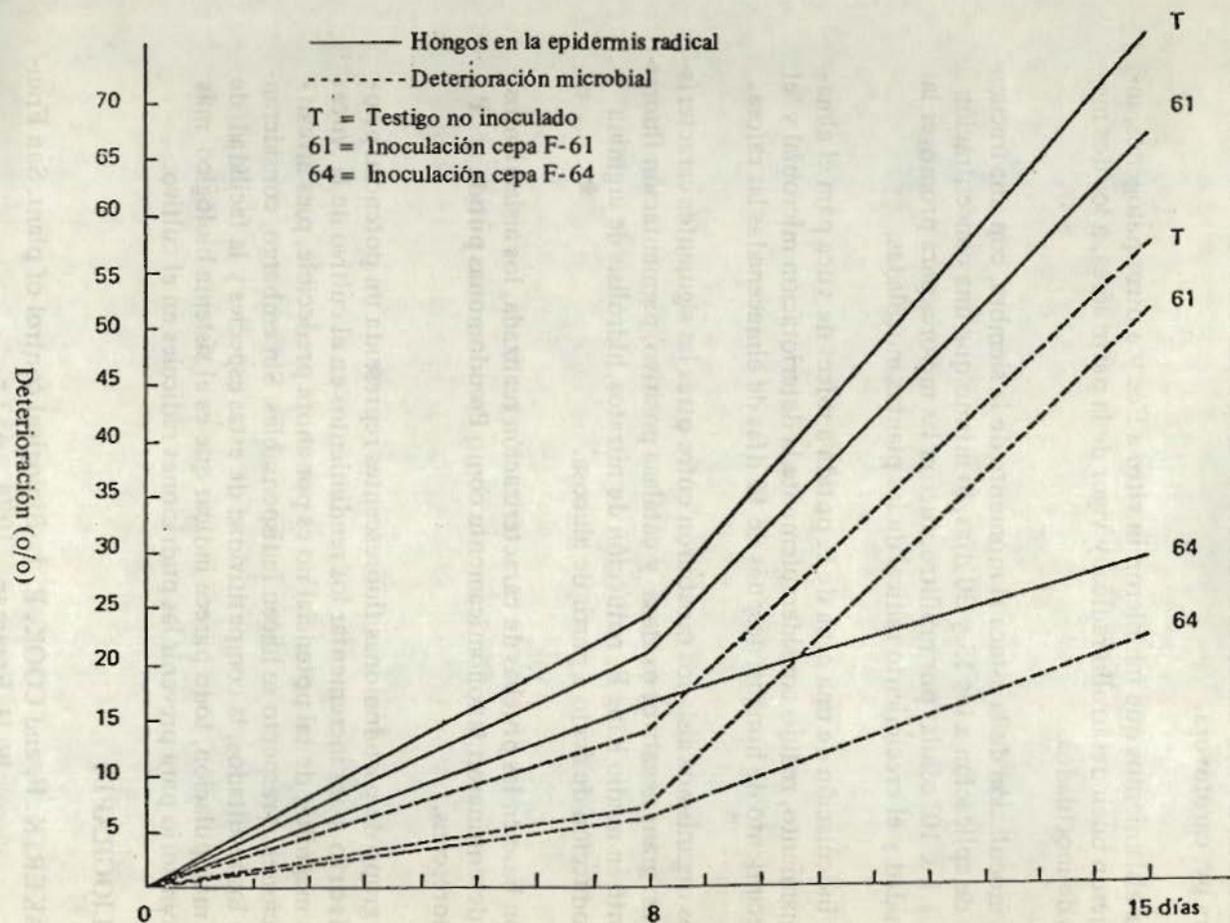


Fig 2. Efecto de la inoculación con dos cepas de *P. putida*, sobre las raíces almacenadas durante 8 y 15 días.

4. CONCLUSIONES

- 4.1. De los aislamientos fluorescentes obtenidos en diferentes regiones de Colombia, 34 o/o inhibieron *in vitro* el crecimiento de *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*.
- 4.2. Los aislamientos que inhibieron *in vitro* a *Ecc* y a otros patógenos, indujeron buen desarrollo radical y vigor de la parte aérea, a los dos meses de inoculados.
- 4.3. La inoculación de la estaca al momento de la siembra, con una frecuencia de aplicación a los 15 y 30 días, lo mismo que una concentración de 1.1×10^9 células por mililitro, fueron las mejores para promover la sanidad y el crecimiento radical de las plantas inoculadas.
- 4.4. La inoculación de una cepa de *P. putida* a raíces de yuca para el almacenamiento, redujo considerablemente la deterioración microbial y el crecimiento de hongos, después de 15 días de almacenadas las raíces.
- 4.5. Los organismos aislados mostraron entre otras las siguientes características: gram negativo, oxidasa y catalasa positivo, pigmentación fluorescente en medio King B, reducción de nitratos, hidrólisis de arginina y producción de ácido a partir de glucosa.
- 4.6. Con base en las pruebas de caracterización realizada, los aislamientos se determinaron taxonómicamente como *Pseudomonas putida* y *P. fluorescens*.
- 4.7. El grupo de pseudomonas fluorescentes representa un potencial promisorio para incrementar los rendimientos en el cultivo de la yuca. La magnitud de tal potencial no es por ahora predecible, pues investigaciones al respecto se hacen indispensables. Sin embargo, considerando los resultados, la competitividad de estas especies y la facilidad de su manipulación, todo parece indicar que es el sistema biológico más promisorio para prevenir las pudriciones radicales en el cultivo.

5. BIBLIOGRAFIA

1. BAKER, K. F. and COOK, R. J. Biological control of plant. San Francisco, W. H. Freeman, 1974. 433 p.
2. BERESOVA, J. F. and NAUMOVA, A. N. A bacterial method for the control of fungus disease of agricultural plant. Mikrobiologiya 8: 186-205. 1939.

3. BLAIR, J. E.; LENNETTE, E. H. and TRUANT, J. P. Manual of clinical microbiology. Bethesda, M. D. 1970.
4. BOOTH, R. H. A review of root rot disease in cassava. In: Proceedings of the Cassava Production Workshop held at CIAT, Cali, 1978 pp: 121 - 133.
5. BROADBENT, P. and BAKER, R. J. Soil suppressive to *Phytophthora* root rot in Australia. *Biological Science* 24: 925. 1971.
6. BROWN, M. E. Seed and root bacterization. *Annual Review of Phytopathology*. 12: 181-198. 1974.
7. BROWN, M. E. and BERINGER, J. E. The potential of antagonist for fungal control. *Agriculture ecosystems & environment* 10: 127-141. 1983.
8. BOOTH, T. J.; SCHROTH, M. N. and SUSLOW, T. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology* 68: 1377-1383. 1978.
9. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Curso sobre Producción de Yuca. Cali, 1976. 432 p.
10. COCK, J. H.; WHOLEY, D.; LOZANO, J. C. y TORO, J. C. Sistema rápido de propagación de yuca. Cali, CIAT, 1976.
11. CHANG, I. P. and KOMMEDAHL, T. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopathology*. 58: 1395-1401. 1968.
12. DOUDOROFF, M. and PALLERONI, N. Y. Genus 1 *Pseudomonas migula* 1894. In: *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 8th. ed. Baltimore, Willian & Wilkins, 1974. pp: 217-243.
13. GEELS, F. P. and SCHIPPERS, B. Selection of antagonistic fluorescens *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Journal of Phytopathology*. 108 (3/4). 1983.

14. GONZALEZ, L. C. Introducción a la Fitopatología. San José, IICA, 1977.
15. HOWELL, C. R. and STIPANOVIC, R. D. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedling with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. The American Phytopathological Society. v. 69. 1979.
16. HUBBARD, J. P.; HORMAN, G. E. and HADON, Y. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum*, on peas seed. The American Phytopathological Society. v 73, n. 5. 1983.
17. KAY, D. E. Root crops. The Tropical Institute, foreign and Commonwealth Office. 254 p.
18. KING, E. O.; WORD, M. K. and RONEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307. 1954.
19. KIRALY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYNASY, F. and VOROS, J. Methods in plant pathology with special reference to breeding for disease resistance. Budapest, Kiraly Aikademiái Kiado, 1974.
20. KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. and MILLER, T. D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathology 70: 1078-1082. 1980.
21. LELLIOT, R. A.; BILLING, E. and HAYWARD, A. C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. J. Appl. Bact. 29 (3). 1963.
22. LIU, S. and BAKER, R. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70: 404. 1980.
23. LOZANO, J. C. and BELLOTTI, A. *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, causal agent of bacterial stem rot of cassava: etiology, epidemiology and control. Cali, CIAT, 1978.
24. LOZANO, J. C. y BOOTH, R. H. Enfermedades de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Cali, CIAT, 1975. (Serie DS-5).

25. LOZANO, J. C.; BELLOTTI, A.; REYES, J. A.; HOWELER, R.; LEIHNER, D. y DOLL, J. Problemas en el cultivo de la yuca. Cali, CIAT, 1981. 288 p.
26. LLANOS, C.; SANCHEZ DE PRAGER, M. Prácticas de Microbiología; Agronomía. Palmira, Universidad Nacional de Colombia, 1982.
27. MERRIMON, P. R.; PRICE, R. D.; BAKER, K. F.; KOLLMARGEN, J. F.; PIGGOTT, T. and RIDGE, E. H. Effects of *Bacillus* and *Streptomyces* spp. applied to seed. In: Biology and control of soil-borne plant pathogens. Minnesota, APS, 1975. pp: 130-133.
28. MISAGHI, I. J.; STOWELL, L. J.; GROGAN, R. G. and SPEARMAN, L. C. Fungistatic activity of water soluble fluorescent Pseudomonads. *Phytopathology*. 72: 33-36. 1982.
29. RUSSELL, E. J. y RUSSELL, E. W. Las condiciones del suelo y el crecimiento de las plantas. 4a. ed. Madrid, Aguilar, 1968.
30. SCHROTH, M. N. and HANCOCK, G. J. Disease-suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science*. 216: 4553. 1982.
31. SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. Manual of microbiological methods. New York, McGraw-Hill, 1957.
32. SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul Minnesota, 1980.
33. SUSLOW, T. V. and SCHROTH, M. N. Rhizobacterias of sugar beets: effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* 72: 199-206. 1982.
34. THE ECONOMIST. Business, finance and science. Natural fungicides. In: The Economist, Londres, Jan. 14, 1984.
35. TORO, J. C. y ATLEE, C. B. Prácticas agronómicas para el cultivo de la yuca. Cali, CIAT, 1981.
36. TOUSSOUN, T. A. Fusarium suppressive soil. *Phytopathology*. 70: 412. 1980.

37. TRONSMO, A. and YSTAAS, A. Biological control of botrytis on apple. *Plant Disease*. 64: 1009. 1980.
38. TWITE, JOHN. *Plant pathological methods; Fungi and Bacteria*. Minneapolis, Burgess, 1974.
39. UTKHEDE, R. S. and RAHE, J. E. Effect of *Bacillus subtilis* on growth and protection onion against white rot. *Phytopathology*, 106: 199-123. 1983.
40. WELLER, D. M. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology* 73: 1548-1553. 1983.
41. WHEATLEY, C. C. Studies on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root post-harvest physiological deterioration. Thesis Ph. D. London University, 1982.