

## Diversidad de pseudomonas fluorescentes en cultivos de papa de la región Cundiboyacense y su actividad antagonista *in vitro* sobre *Rhizoctonia solani*

### Diversity of Fluorescent Pseudomonas in Potato Crops of the Cundiboyacense Region and its *in vitro* Antagonic Activity against *Rhizoctonia solani*.

D. Uribe, E. Ortiz, M. Portillo, G. Bautista y J. Cerón\*

#### RESUMEN

Las pseudomonas fluorescentes son unas de las bacterias benéficas más importantes a nivel de la rizosfera gracias a que pueden controlar algunos fitopatógenos habituales del suelo como resultado de su capacidad antagonista. Hay muy pocos trabajos realizados para conocer la composición y diversidad de pseudomonas fluorescentes en países tropicales. En este trabajo se determinó la composición de pseudomonas fluorescentes provenientes de diferentes cultivos de papa ubicados en la región Cundiboyacense, entre 2.100 y 3.200 msnm, la cual es considerada la zona de mayor producción de papa de Colombia. Así mismo se evaluó el efecto de algunas prácticas de cultivo sobre dicha composición. Finalmente se determinó la capacidad de antagonismo de algunos aislamientos de pseudomonas fluorescentes contra *Rhizoctonia solani*. Fueron evaluadas 45 muestras de rizosfera y rizoplano de cultivos de papa provenientes de 15 campos de papa diferentes. Las muestras se procesaron usando una modificación del medio King B, la cual resultó ser más eficiente para aislar pseudomonas fluorescentes, que otras reportadas en la literatura. El 80,7% y 82,7% de las pseudomonas fluorescentes aisladas en rizosfera y rizoplano, respectivamente, fueron *Pseudomonas fluorescens*, mostrando poca diversidad en las muestras evaluadas. Por otra parte se observó un efecto de la estrategia de rotación de cultivo maíz-papa, sobre el número de pseudomonas fluorescentes aisladas de la rizosfera. Estos resultados tienen implicaciones para el diseño de estrategias de manejo integrado de plagas en los cultivos de los países tropicales. Finalmente se encontraron aislamientos nativos con actividad antagonista sobre

*Rhizoctonia solani* en los ensayos *in vitro*. Los resultados anteriores, si bien no aseguran un control eficaz del patógeno en condiciones de campo, sí dan una idea del potencial biocontrolador de la especie aplicados como comunidades bacterianas, cepas o subproductos de éstas.

**Palabras clave:** *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizoctonia solani*, efecto rizosférico, microbiología agrícola, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*, ecología microbiana.

#### SUMMARY

Fluorescent *Pseudomonas* are one of the most important beneficial bacteria of the rhizosphere. It is because they can control some soil borne phytopathogen agents as a result of their antagonistic capacity. There are few works about the composition and diversity of fluorescent *Pseudomonas* in tropical countries. In this work we studied the composition of fluorescent *Pseudomonas* from different potato crops located at the Cundiboyacense region between 2100 and 3200 msl, which is the most important area of potato production in Colombia. This study also assesses the effect of some crop practices variables on rhizosphere bacteria richness and diversity. Finally, it was determined the antagonistic capacity of some *Pseudomonas fluorescens* isolates against *Rhizoctonia solani*. A total of 45 rhizosphere samples were taken from 15 potato fields. To isolate the *Pseudomonas* it was used king B medium modified by us. Our results showed that this modified medium consistently allowed a more efficient recovery of the fluorescent *Pseudomonas* than the media reported in the literature. 80.7% and 82.7% of the fluorescent *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere and rizoplano respectively were *Pseudomonas fluorescens*. It suggests a low fluorescent pseudomonas diversity. Our work also denotes an effect of the maize-potato crop rotation strategy on the amount of the fluorescent *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere. These results may have importance in designing appropriate strategies for bio-controlling soil

\* Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A.A 14-490. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia, e-mail: [duribe@ibun.unal.edu.co](mailto:duribe@ibun.unal.edu.co)

borne phytopathogens. In tropical countries like Colombia, this knowledge might help to improve crop yields. Finally it was found native isolates with antagonistic activity against *Rhizoctonia solani* in the bioassays *in vitro*, such results if not assure an efficient control of the pathogen in field conditions, may give an idea of the potentiality of *P. fluorescens* to be applied as bacterial community, strains or derived products of them.

**Key words:** *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizoctonia solani*, rhizospheric effect, agricultural microbiology, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*, microbial ecology.

## INTRODUCCIÓN

Las *pseudomonas*, y especialmente las fluorescentes, son bacterias de gran importancia como colonizadores vegetales (Campbell, 1987). Su importancia radica en que ellas usualmente producen un efecto benéfico sobre las plantas, bien sea como promotores del crecimiento vegetal (Van Overbeek and Van Elsas, 1995) o como inhibidores de crecimiento de algunos hongos o bacterias fitopatógenas (Carruthers *et al.*, 1994; De la Cruz *et al.*, 1992). Los mecanismos sugeridos para lograr tal inhibición incluyen la producción de antibióticos (Hammer *et al.*, 1997; Raaijmakers *et al.*, 1997; Thomashow *et al.*, 1990; Van Overbeek and Van Elsas, 1995), la producción de compuestos quelantes del hierro (Colyer and Mount, 1984; Elad and Baker, 1985; Loper and Lindow, 1994; Yuen and Schroth, 1986), producción de enzimas hidrolíticas (Hammer *et al.*, 1997) y competencia por sitios nutricionalmente favorables (o ricos en nutrientes) (Suslow and Schroth, 1982). Las *pseudomonas* fluorescentes se pueden encontrar en la superficie foliar y al nivel de la raíz, especialmente en la rizosfera, donde la colonización de la microflora depende de características como el tipo de planta y el tipo, manejo e irrigación del suelo (Alexander, 1977; Bahme and Schroth, 1987; Frioni, 1990; Lemanceau *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1989).

Algunos trabajos realizados previamente han demostrado la influencia de la planta en la selección de los microorganismos presentes en su propia rizosfera (Lemanceau *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1989). En este sentido, Lemanceau *et al.*, (1995), encontraron diferencias en términos de la diversidad y composición de las *pseudomonas* fluorescentes en la raíz de plantas de tomate y lino. Sus resultados sugieren que tales diferencias pueden ser explicadas en términos de la composición del exudado radicular, mostrando así la importancia del efecto rizosférico para seleccionar la microflora propia de un sistema radicular determinado. Por otra parte, si bien la planta puede influir en el tipo de microflora presente en su rizosfera, ésta obviamente va a depender de las poblaciones presen-

tes en el suelo, las cuales a su vez van a estar determinadas por una serie de factores que van desde los efectos rizosféricos ejercidos por las plantas de cultivos anteriores hasta las condiciones físico-químicas del suelo (Bahme and Schroth, 1987; Campbell, 1987).

Colombia es un país tropical, considerado como el principal productor de papa de Latinoamérica (FAO, 1999). Dicho cultivo se ve afectado en la región por una serie de microorganismos fitopatógenos, los cuales podrían llegar a ser manejados mediante una adecuada composición rizosférica de las *pseudomonas* fluorescentes presentes en el suelo. Sin embargo, a pesar de la gran biodiversidad presente en nuestro país, existe muy poco conocimiento acerca de la composición microbiana de nuestros suelos. Por esta razón, en este trabajo se pretende describir la composición y diversidad de las *pseudomonas* fluorescentes presentes en diferentes cultivos de papa de la región del Altiplano Cundiboyacense, zona responsable de alrededor del 60% de la producción del tubérculo en nuestro país (Fedepapa, 1997). Por otra parte se determinó si existe alguna variación en dicha composición como resultado de algunas prácticas de cultivo, como la estrategia de rotación de cultivos en las zonas analizadas, y la variedad de papa sembrada. Además se buscó conocer el efecto de la edad del cultivo sobre las poblaciones de *pseudomonas* fluorescentes. Por último se evaluó mediante la realización de ensayos *in Vitro* el potencial antagonista de algunos aislamientos nativos de *R. fluorescens* contra un aislamiento de *Rhizoctonia solani*, obtenido directamente de tubérculos infestados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de muestras

Muestras de raíces completas obtenidas de plantas de *Solanum tuberosum* y *S. phureja* fueron coleccionadas en 15 zonas de cultivos ubicados en la región cundiboyacense (a una altura entre los 2.100 msnm y los 3.200 msnm). De cada cultivo se recolectaron tres plantas diferentes evitando tomarlas de los bordes del mismo, para no introducir alguna falta de uniformidad de la muestra por este efecto.

### Influencia de las prácticas de cultivo en las poblaciones de *pseudomonas* fluorescentes

Con el objeto de evaluar el efecto de edad del cultivo sobre la diversidad y riqueza de las *pseudomonas*, se seleccionaron 4 categorías diferentes: 2 a 2,9 meses después de siembra (mds); 3 a 3,9 mds; 4 a 4,9 mds y 5 a 6 mds. De las diferentes categorías se obtuvieron 8, 10, 16 y 11 muestras de raíz, respectivamente. La estrategia de rotación de culti-

vos también fue evaluada mediante el análisis de muestras de cultivo provenientes de rotaciones papa-pasto, papa-maíz y papa (*S. tuberosum*) - papa (*S. phureja*) con 33, 6 y 6 muestras, respectivamente. Por último, con el objeto de determinar el efecto de la especie de papa sobre la diversidad y riqueza de pseudomonas fluorescentes, se tomaron muestras de rizosfera provenientes de cultivos de *S. tuberosum* y *S. phureja* (36 y 9 muestras, respectivamente).

### Selección del medio de cultivo

Partiendo de algunas cepas patrón de pseudomonas fluorescentes (*Pseudomonas auroginosa* ATCC 27853, *P. putida* y *P. fluorescens* del Centro de Investigaciones Microbiológicas, CIMIC), se evaluaron los patrones de fluorescencia reportados en la literatura para estas cepas en los medios de cultivo King B (King *et al.*, 1954; Merck, 1994). Sin embargo, ninguno de estos dos medios mostró un patrón de fluorescencia bien definido en las cepas evaluadas. Por tal motivo se realizaron algunas variaciones al medio de cultivo que permitieron optimizar el registro de fluorescencia al ser evaluado en presencia de luz ultravioleta. El medio King B modificado utilizado en este estudio fue el siguiente: proteasa peptona No. 3 de Difco 20 g/l; 87% Glicerol 10 ml/l;  $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$  1.96g/l;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1,5g/l pH 7,2.

### Tratamiento de la muestra

Pseudomonas fluorescentes de la rizosfera y rizoplano fueron aislados de acuerdo con algunas modificaciones realizadas a la metodología de Lemanceau *et al.* (1995). Las suspensiones rizosféricas se obtuvieron lavando suavemente diez gramos de raíz por cada planta en 90 ml de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1 M previamente esterilizado. Las suspensiones de rizoplano fueron obtenidas agitando (a 600 rpm) el sistema radicular previamente tratado, en presencia de 90 ml de una solución de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1 M, en la cual se han adicionado 20 perlas de vidrio estériles. Esta agitación se realiza durante diez minutos (Dandurand and Knudsen, 1997; Lemanceau *et al.*, 1995). Posteriormente se realizan diluciones seriadas de los dos tipos de muestras, las cuales fueron plateadas en medio King B modificado. Cada dilución fue incubada por 72 h a 25°C. La dilución con un recuento entre 10 y 30 unidades formadoras de colonias (ufc) de pseudomonas fluorescentes fueron contadas en presencia de luz UV (a una longitud de onda de 302 nm). Un máximo de 5 colonias de pseudomonas fluorescentes por muestra rizosférica analizada, se seleccionaron aleatoriamente, con el objeto de caracterizarlas mediante el sistema de pruebas bioquímicas de la casa comercial Biomerieux API 20 NE. Cada uno de los aislamientos caracterizados taxonómicamente fueron criopreservados a -70°C en medio Gherna (1986).

### Pruebas bioquímicas

Los aislamientos seleccionados fueron determinados taxonómicamente por caracterización microscópica, determinación de la presencia de oxidasa y la producción de pigmento fluorescente, de acuerdo con lo recomendado por R. K. Noel y J. G. Holt (1984) y King *et al.* (1954). Además de esto se realizaron 8 pruebas convencionales y pruebas de asimilación, basadas en la capacidad del microorganismo para asimilar 12 carbohidratos diferentes. Estas pruebas fueron realizadas con las bandas del sistema API 20NE (API Systems, Francia), de acuerdo con las recomendaciones de API-bioMerieux (La Balme les Grottes, Montalieu Vercieux, France). Las cepas de referencia mencionadas anteriormente fueron usadas para evaluar el sistema de caracterización.

### Inhibición de crecimiento *in vitro* de *Rhizoctonia solani* por aislamientos de *Pseudomonas fluorescens*

Se tomó una colonia de 11 aislamientos de *P. fluorescens* previamente crecidos durante 24 h a 25°C en agar LB. Dicha colonia se sembró en líneas paralelas separadas una de otra por 4 cm en cajas de petri con PDA. Las cajas se incubaron a 25°C durante 72 horas, tiempo después del cual se tomó una porción micelial de 5 mm<sup>2</sup> de una colonia de 6 días de crecimiento de *R. solana* y se colocó en el centro de la caja de petri, entre las dos estrías de crecimiento de la *P. fluorescens*. Después de 6 días de incubación se midió el radio de crecimiento de la colonia fúngica (desde el punto central hasta el extremo de la colonia). El porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico corresponde a la diferencia entre el total de crecimiento posible (100%) y el crecimiento obtenido por el hongo en presencia del aislamiento. Como controles para esta prueba se empleó el crecimiento del hongo sin presencia de *P. fluorescens* y el hongo en presencia de una cepa de *E. coli* sembrada en las mismas condiciones descritas antes, con el objeto de descartar inhibición del hongo por efecto de utilización de espacio.

### Determinación de la capacidad de algunos aislamientos de *P. fluorescens* para degradar el tubérculo de papa

Seis de los 11 aislamientos fueron aleatoriamente seleccionados con el objeto de determinar la capacidad para crecer y degradar el tubérculo de papa. Esto se hace con el objeto de descartar que estos aislamientos estuviesen de alguna forma asociados a producir eventualmente alguna pudrición de la papa en condiciones de almacenamiento. Esta prueba consistió básicamente en inocular tres trozos de papa por tratamiento con 100 µl de soluciones concen-

tradas ( $1 \times 10^6$  ufc/ml). Se dejó en incubación durante 48 horas a 25°C, empleando cinco réplicas cada vez. Al final de este periodo se midió la dureza del tubérculo. Los tubérculos degradados aparecen de textura blanda. Como control positivo se tomó un aislamiento de *P. fluorescens* que en estudios preliminares había presentado resultados positivos para esta prueba.

### Tratamiento estadístico de los datos

Se realizaron diferentes pruebas estadísticas como la suma del rango de Wilcoxon y el análisis de varianza y prueba de Duncan. Así mismo se trazaron curvas de regresión logarítmica y se utilizaron coeficientes de correlación para analizar los datos. Los efectos fueron considerados significativos si  $P < 0,05$ ; débilmente significativos si  $0,05 < P \leq 0,1$  y no significativos si  $P > 0,1$ . Los recuentos de ufc fueron transformados a  $\log_{10}$  para disminuir las variaciones entre poblaciones y permitir la inclusión de valores de cero ufc (Campbell, 1989; De la Cruz *et al.*, 1992; Glandorf *et al.*, 1994; Miller, 1989).

## RESULTADOS

### Características de los pigmentos fluorescentes en el medio King B

El color, la intensidad y el tiempo de permanencia de la fluorescencia obtenida con algunas cepas de referencia en los medios King B evaluados, no se comportaron de acuerdo con lo descrito en la literatura (King *et al.*, 1954; Merck, 1994). Por esta razón se realizó la modificación mencionada al medio de cultivo, la cual nos permitió obtener un mejor patrón de fluorescencia de las cepas de referencia y las cepas nativas aisladas.

En el medio King B modificado, los pigmentos fluorescentes en luz ultravioleta presentaron diferentes patrones que variaron del azul claro a un verde amarillento intenso. Algunos aislamientos producen un pigmento café después de las 72 horas de incubación (datos no publicados).

### Efecto de la rizosfera y/o el rizoplano sobre el número de pseudomonas fluorescentes presentes en cultivos de papa

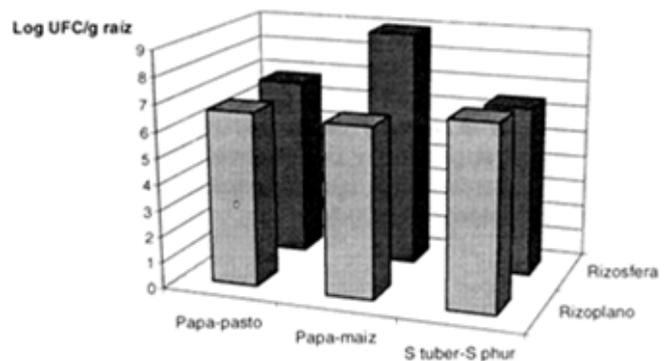
Este estudio consideró las áreas de rizoplano y rizosfera de acuerdo con la metodología de Lemanceau *et al.* (1995). Esto supone la definición de rizosfera como el suelo unido a la raíz, y el rizoplano como el suelo sobre la superficie de las raíces. El presente trabajo no mostró diferencia estadísticamente significativa entre el rizoplano y la rizosfera en términos de la diversidad y cantidad de pseudomonas

fluorescentes aisladas. La única excepción se dio cuando la estrategia de rotación de cultivos fue papa-maíz (figura 1).

### Influencia de las prácticas de cultivo en el número y diversidad de pseudomonas fluorescentes

En este estudio se analizó el efecto de la especie de papa y la edad del cultivo sobre el número y/o la diversidad de pseudomonas fluorescentes a nivel rizosférico o de rizoplano. Los resultados obtenidos no mostraron diferencia estadísticamente significativa como resultado de las variables mencionadas en términos de la diversidad o cantidad de las pseudomonas aisladas.

En este trabajo se analizó la influencia de tres sistemas de rotación de cultivo diferentes sobre la cantidad de pseudomonas fluorescentes presentes en cada muestra. Las clases de rotación de cultivo analizadas fueron papa-pasto, papa maíz y papa (*S. tuberosum*) - papa criolla (*S. phureja*). La figura 1 muestra el efecto de cada estrategia de rotación sobre las poblaciones de pseudomonas fluorescentes a nivel rizosférico y de rizoplano. La estrategia papa-maíz mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,001$ ) en la cantidad de pseudomonas fluorescentes aisladas a nivel de la rizosfera, pero a nivel del rizoplano no presentó diferencias en las muestras analizadas.



**Figura 1.** Efecto de diferentes estrategias de rotación de cultivos en la población de pseudomonas fluorescentes presentes a nivel de rizosfera y rizoplano de plantas de papa (*S. tuberosum* y *S. phureja*).

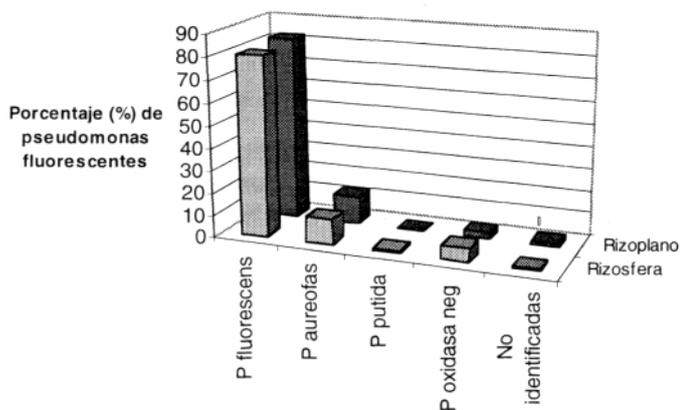
### Diversidad de pseudomonas fluorescentes

Con el ánimo de conocer la diversidad de pseudomonas fluorescentes, propia de las zonas de cultivo analizadas, se caracterizaron taxonómicamente 224 colonias fluorescentes aisladas en el medio de cultivo King B modificado. Las colo-

nias se seleccionaron de todas las muestras de raíz recolectadas durante el presente estudio. Un promedio de 5 colonias por muestra fueron analizadas; se obtuvieron 114 aislamientos provenientes de rizosfera y 110 de rizoplano.

La presencia de las enzimas catalasa y oxidasa son características diagnósticas para las pseudomonas fluorescentes. Los aislamientos seleccionados fueron positivos para catalasa y todos (excepto 10) fueron positivos para la prueba de oxidasa. En ese contexto, 214 aislamientos (catalasa y oxidasa positivos) fueron identificados por el sistema comercial API 20 NE de BioMerioux. La figura 2 indica la baja diversidad encontrada a nivel de rizosfera y rizoplano en las muestras de suelo provenientes de cultivos de papa analizadas en este estudio. *P. fluorescens* fue la especie más distribuida en la rizosfera (80,7%) y el rizoplano (82,7%), seguida por *P. aureofasciens* (11,4% en la rizosfera y 12,7 en el rizoplano) y *P. putida* con únicamente una colonia (0,9%) en la rizosfera. No hay diferencias significativas en términos de la diversidad encontrada en ambas zonas radicales (ver figura 2).

El sistema de identificación API 20 NE produce un porcentaje de identificación para cada aislamiento analizado. Este porcentaje está relacionado con el grado de certeza que se tiene de que el grupo taxonómico asignado para cada cepa es el correcto. De todos los aislamientos seleccionados, 211 fueron correctamente identificados por el sistema como pseudomonas fluorescentes: 40 presentaron un porcentaje de identificación entre 63 y 70%; 25 tuvieron un porcentaje de identificación entre 70 y 90% y 146 entre 90 y 100%. Los aislamientos con un porcentaje de identificación por debajo de 90% fueron confirmados por las pruebas de acidificación de la xilosa y de asimilación del sorbitol de acuerdo con lo sugerido por BioMerioux Co. Las pruebas mencionadas confirmaron la identificación taxonómica obtenida por el sistema API 20 NE.



**Figura 2.** Porcentaje de la presencia de las diferentes especies de pseudomonas fluorescentes a nivel de rizosfera y rizoplano de plantas de papa.

### Antagonismo *in vitro* de *P. fluorescens* contra *R. Solani*

Se obtuvo diferencia significativa a nivel del 5% ( $P < 0,0001$ ) entre los diferentes aislamientos en relación con su efecto sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani*. En la tabla 1 se puede observar dicho comportamiento, el cual define seis grupos diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey, aunque a nivel práctico se pueden ubicar tres grupos diferentes: aislamientos que presentaron mayor porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo IBUN-Pfl-060, IBUN-Pfl-033 y IBUN-Pfl-029; los aislamientos que afectaron medianamente el crecimiento del patógeno IBUN-Pfl-062, IBUN-Pfl-025, IBUN-Pfl-078, IBUN-Pfl-102 y IBUN-Pfl-066; y los aislamientos IBUN-Pfl-030, IBUN-Pfl-063 y IBUN-Pfl-096, que no afectaron el crecimiento del patógeno con 0% de inhibición del crecimiento, aunque vale mencionar que estos aislamientos vieron afectadas características morfológicas como intensidad de coloración de la colonia.

Respecto a la prueba de degradación del tubérculo, ninguno de los aislamientos de *P. fluorescens* evaluados presentaron resultados positivos para esta prueba, lo cual confirma que al menos para estos aislamientos no hay riesgo de que se desarrolle el efecto de pudrición de los tubérculos en condiciones de almacenamiento.

### ANÁLISIS

La distribución de pseudomonas fluorescentes ha sido estudiada desde diferentes ángulos. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han sido realizados en países templados (Lemanceau *et al.*, 1995; Loper and Lindow, 1994; Raaijmakers *et al.*, 1997) donde la dinámica estacional de temperatura, humedad, prácticas de cultivo y precipitación, entre otros, son muy diferentes cuando las comparamos con países tropicales. Esta situación genera un interés especial en comprender la composición y diversidad de pseudomonas fluorescentes en campos de cultivo de papa de un país tropical como Colombia. Además de lo mencionado anteriormente, muy pocos trabajos han sido realizados en condiciones de campo (Lemanceau *et al.*, 1995), donde el comportamiento poblacional de las pseudomonas es diferente en comparación con las condiciones de invernadero.

El tratamiento dado a las zonas de rizosfera en este trabajo, supone una estrecha relación entre el suelo de soporte y el sistema de la raíz de la planta. Esto es importante si tenemos en cuenta que la composición de la microflora a nivel de la rizosfera y el rizoplano es considerada como un gradiente de microorganismos desde el borde de la raíz hasta el extremo externo de la rizosfera, y por tanto este

**Tabla 1.** Prueba de inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia solani* *in vitro* y de la capacidad de degradación de tubérculos de papa por parte de algunos aislamientos de *Pseudomonas fluorescens*

Aislamientos <i>P. fluorescens</i>	Porcentaje de inhibición (%)	Prueba de degradación en papa
IBUN-Pfl-060	80 a <sup>1</sup>	ND <sup>2</sup>
IBUN-Pfl-033	79 a	Negativo
IBUN-Pfl-029	77 a	ND
IBUN-Pfl-066	69 b	ND
IBUN-Pfl-102	53 c	ND
IBUN-Pfl-078	43 c	ND
IBUN-Pfl-025	22 d	Negativo
IBUN-Pfl-062	10 e	Negativo
IBUN-Pfl-030	0 f	ND
IBUN-Pfl-063	0 f	Negativo
IBUN-Pfl-096	0 f	Negativo
<i>E. coli</i> ( <i>DH5alfa</i> )	0 f	Negativo
Control neg. antagonismo	0 f	ND
Control pos. degradación	ND	Positivo

<sup>1</sup> Aislamientos con letras diferentes poseen una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba de Tukey.  
<sup>2</sup> ND: No determinado.

gradiente es dependiente del exudado radicular (Frioni, 1990; Lemanceau *et al.*, 1995; Lynch, 1990; Harvey *et al.*, 1993).

De acuerdo con lo anterior, el microhábitat específico y por consiguiente la composición y actividad de los microorganismos a nivel rizosférico deben estar principalmente determinados por los exudados secretados por la planta (Frioni, 1990; Lemanceau *et al.*, 1995; Lynch, 1990) y algunas condiciones físicas y químicas del suelo como materia orgánica, pH, humedad y nutrientes minerales (Campbell, 1987; Harvey *et al.*, 1993). Dentro de este contexto algunos autores sugieren que la especie, línea o cultivar, sembrada en un cultivo (Campbell, 1987; Lemanceau *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1989; Harvey *et al.*, 1993) y la edad de la planta (Campbell, 1987; Darbyshire and Greaves, 1976; Foster, 1986; Harvey *et al.*, 1993) son dos variables vegetales que deben ser consideradas, cuando se pretende explicar la estructura, composición y actividad microbiana de la rizosfera y el rizoplano. Tal efecto se explica por los cambios nutricionales de sus exudados radiculares como consecuencia de las diferencias en la fisiología vegetal (Harvey *et al.*, 1993).

En este trabajo, contrario de lo esperado, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la población de pseudomonas fluorescentes, cuando se analizaron las muestras provenientes de dos especies de papa (*S. tuberosum* con 6,25 Log ufc/g raíz y *S. phureja* con 5,75 Log UFC/g raíz), ni cuando se evaluaron éstas a diferentes

edades post-siembra. Tales resultados podrían ser explicados por el uso intensivo de insumos agrícolas en la zona de estudio, los cuales pueden alcanzar hasta 18 aplicaciones por ciclo vegetativo, únicamente para el control de hongos e insectos. Según lo sugerido por Bolton *et al.* (en Harvey *et al.*, 1993), un exceso de pesticidas puede llegar a modificar las poblaciones microbianas a nivel rizosférico, homogeneizando dichas poblaciones, contrarrestando así el posible efecto de las diferencias en los exudados radiculares.

En el presente trabajo se encontró una baja diversidad de pseudomonas fluorescentes a nivel de la raíz de las plantas de papa evaluadas, registrándose la predominancia de *P. fluorescens* en más del 80% de las muestras. Resultados similares, donde se muestra el efecto de las especies vegetales en la selección de un tipo específico de microorganismo a nivel rizosférico (Harvey *et al.*, 1993) o donde predomina una especie de pseudomonas fluorescentes de acuerdo con el tipo de planta, han sido previamente reportados (Lemanceau *et al.*, 1995). Lemanceau y colaboradores (1995) observaron que en las raíces de plantas de lino usualmente predomina *P. putida*, mientras que en plantas de tomate, *P. fluorescens* es la especie más importante. Cabe recordar que tanto el tomate como la papa pertenecen a la familia taxonómica lycopodiaceae, lo cual sugiere que su cercanía evolutiva tiene alguna incidencia en el tipo de exudados radiculares, de tal forma que les permita seleccionar la misma especie de pseudomonas fluorescentes.

Sin embargo, se deben realizar estudios más detallados para poder demostrar tal hipótesis.

La importancia de conocer la predominancia de *P. fluorescens* en la rizosfera de papa reside en que esto nos permite dirigir los esfuerzos de búsqueda de pseudomonas fluorescentes que favorezcan el crecimiento de los cultivos de papa (Loper *et al.*, 1994) a cepas o consorcios bacterianos ricos en *P. fluorescens* que puedan establecer una asociación exitosa a nivel de la raíz, con estas plantas (Harvey *et al.*, 1993).

La rotación de cultivos es una práctica agrícola muy común en los programas de manejo integrado de plagas en los países tropicales, donde no existen restricciones estacionales para la siembra del suelo durante todo el año. En este contexto, un buen diseño de rotación de cultivos permite mantener la productividad del suelo a través del tiempo. Desde el punto de vista microbiológico, el principal efecto de la rotación consiste en la renovación de la microflora benéfica del suelo (Geels and Schippers, 1983). Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que hay un incremento en la población de pseudomonas fluorescentes aisladas en los cultivos de papa, a nivel de la rizosfera, cuando éstos están dentro de la estrategia de rotación maíz-papa (ver figura 1).

La capacidad del maíz para mantener una mayor población de pseudomonas fluorescentes a nivel de la rizosfera en comparación con el pasto, ha sido previamente sugerida por Miller *et al.*, (1989) quien encontró de dos a seis veces más pseudomonas fluorescentes en dos cultivariedades de maíz al compararlas con dos líneas de pasto (*Poa pratense*), aunque cabe mencionar que tal estudio no involucró ningún tipo de análisis dentro de las estrategias de rotación de cultivo. Por otra parte es conocido que las poblaciones de *P. fluorescens* pueden persistir en suelo no rizosférico durante el tiempo comprendido por una estación de siembra (Bahme and Schroth, 1987; Harvey *et al.*, 1993). Además de esto, Stroo *et al.*, (1988) (en Harvey *et al.*, 1993) comprobó que *Pseudomonas sp.* introducidas dentro de residuos de cebada, poseen la capacidad de colonizar las raíces de un cultivo de trigo de invierno, demostrando así que las bacterias que colonizan residuos de un cultivo anterior pueden también colonizar el siguiente cultivo.

Los trabajos mencionados dan algunas ideas de las posibles razones por las cuales se encontró un mayor número de aislamientos de *P. fluorescens* en los cultivos de papa que presentaban la estrategia de rotación maíz-papa, en comparación con las rotaciones papa-pasto o papa-papa. Este hallazgo tiene grandes implicaciones sobre los cultivos agrícolas en los suelos tropicales, debido a que supone que un diseño adecuado de rotación de cultivos nos permi-

tiría establecer la permanencia de microfauna benéfica en los suelos de cultivo. Dicha microfauna eventualmente podría ayudar a suprimir algunas de las enfermedades causadas por fitopatógenos del suelo, lo cual mejoraría el rendimiento de los cultivos.

De los 11 aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* probados, 8 (el 72,7%) mostraron la capacidad de inhibir significativamente el crecimiento de *R. solani in vitro*. Según reportes previos de *P. fluorescens* contra *R. Solani*, este efecto de inhibición está determinado por la producción de sustancias antimicrobianas que pueden ser del tipo pyrrolnitrín (Howell and Stipanovic 1978; De Freitas and Germida, 1991; Cartwright *et al.*, 1995; Kirner *et al.*, 1998), fenazinas, PCA, pyoluteorín y 2-4 diacetilfluoroglucinol (Thomashow *et al.*, 1990; Cartwright and Benson, 1995; Rodríguez and Pfender, 1997).

De acuerdo con lo indicado en la tabla 1, el nivel de inhibición de crecimiento del patógeno fue diferente entre los aislamientos. Esta variabilidad en la respuesta de inhibición parece ser una característica típica para la especie, como lo sugiere el trabajo de Cartwright y Benson (1995), quienes encontraron la misma variabilidad en 10 aislamientos de *P. fluorescens* sobre cepas de *R. solani*. De esta forma tal variabilidad pudo presentarse por producción de diferentes sustancias antimicrobianas o diferente cantidad de ellas en cada uno de los aislamientos, que no pueden ser detectadas con la técnica de antagonismo empleada. Por otra parte, características como la composición del medio de cultivo pueden afectar de forma diferente la expresión de tales antibióticos entre los aislamientos (Douglas y Guterson, 1986; Rosales *et al.*, 1995).

Según lo reportado por Lewis y Papavizas (1985) y Millus y Rothrock (1997), existe poca o ninguna correlación entre el comportamiento mostrado *in vitro* y la habilidad para reducir o evitar la enfermedad en invernadero o en campo. Esto puede ser explicado ya que la producción de una sustancia antimicrobiana sólo es uno de los factores necesarios para lograr el establecimiento de una relación antagonista exitosa a nivel rizosférico. Sin embargo, estudios de este tipo permiten conocer características intrínsecas de los aislamientos que pueden ser de interés agronómico y/o biotecnológico, toda vez que se están mostrando alternativas para el manejo de agentes fitopatógenos de interés agrícola en una gran variedad de cultivos.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio no se encontró ningún efecto en términos de la diversidad y riqueza de pseudomonas fluorescentes, en las diferentes zonas evaluadas, cuando

se analizaron variables como edad del cultivo, especie de papa y otras no mencionadas, como altura sobre el nivel del mar y temperatura.

Los resultados encontrados sugieren que la rotación de cultivos es una variable importante al momento de determinar la riqueza de las poblaciones de pseudomonas fluorescentes en el cultivo de papa. Entre los tratamientos analizados, la rotación maíz-pasto favorece la presencia de las poblaciones de pseudomonas en comparación con otras estrategias de rotación. Esta característica tiene implicaciones significativas dentro de la estrategia de manejo integrado de las plagas del cultivo.

Existe muy poca diversidad de pseudomonas fluorescentes en los cultivos de papa analizados, encontrándose que más del 80% de los aislamientos caracterizados taxonómicamente corresponden a la especie *Pseudomonas fluorescens*. Tal característica se puede dar por una selec-

ción poblacional asociada con la rizosfera de las especies de papa analizadas, mediante una selección artificial por efecto del uso intensivo de productos químicos en las prácticas de cultivo de la papa.

Finalmente, algunos aislamientos presentaron una buena capacidad de inhibición del crecimiento de *R. solani* en condiciones *in vitro*, lo cual si bien no permite asumir una aplicación de estos aislamientos para el manejo de la plaga en campo, sí son indicativos del potencial biocontrolador de la especie aplicados como comunidades bacterianas, cepas o subproductos de éstas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a la financiación de Colciencias y al respaldo del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

## REFERENCIAS

- Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology. Ed John Wiley and sons. 2nd. ed. Canadá, pp. 16-27, 423-437.
- Bahme, J. B. and Schroth, M. N. 1987. Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathology*. vol. 77.7:1093-1100.
- Campbell, R. 1987. Ecología microbiana. México D.F. Ed Limusa, pp. 109-152.
- Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Ed. Cambridge University Press. New York, pp. 112-159.
- Carruthers, F. L. Conner, A. J. and Mahanty, H. 1994. Identification of a genetic locus in *Pseudomonas aureofaciens* involved in fungal inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:71-77.
- Cartwright, D. K. and Benson, D. M. 1995. Comparison of *Pseudomonas* species and application techniques for biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. *Plant Dis.* 79:309-313.
- Cartwright, D. K., Chillón, W. S. and Benson, D. M. 1995. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:211-216.
- Clays-Josserand, A., Lemanceau, R. Philippot, L. and R. Lensi. 1995. Influence of two plant species (flax and tomato) on the distribution of nitrogen dissimilative abilities within fluorescent *pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Appl.* vol. 61. 5:1745-1749.
- Colyer, R. D. and Mount, M. S. 1984. Bacterization of potatoes with *Pseudomonas pulida* and its influence on postharvested soft rot diseases. *Plant Dis.* 68:703-706.
- Dandurand, Land Knudsen, G. 1997. Sampling microbes from the rhizosphere and phyllosphere. en: Manual of environmental microbiology. American society for microbiology press. Washington. D. C., pp. 391-399.
- Darbyshire, J. F. and Greaves, M. R. 1976. Protozoan and bacteria in the rhizosphere of *Sinapis alba* L., *Trifolium repens* L. and *Lolium perenne* L. *Canadian Journal of Microbiology*, 13:1057-1068.
- De Freitas, J. R. and Germida, J. J. 1991. *Pseudomonas cepacia* and *P. putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Mycology* 37:780-784.
- De La Cruz, A., Poplawsky, R. and Wiese, M. 1992. Biological suppression of potato ring rot by fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1986-1991.
- Douglas, W. J. Jr. and Gutterson N. 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Appl and Environ. Microbiol.* 52:1183-1189.
- Elad, Y. and Baker, R. 1985. The role of competition for iron and carbón in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75:1053-1059.
- FAO. 1999. Anuario de producción agrícola mundial.
- Fedepapa. 1997. *Revista papas colombianas*. Ed. Comunicaciones y asociados Ltda., pp. 258-261.
- Foster, R. C. 1986. The ultrastructure of the rizoplane and rhizosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:211-234.
- Frioni, L. 1990. Ecología microbiana del suelo. Departamento de Publicaciones y Ediciones de la Universidad de la República. Montevideo, Uruguay, pp. 21, 33-41, 399-419, 465-466.
- Geels, F. P. and B. Schippers. 1983. Reduction of yields depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathol. Z.* 108:12-18.
- Ghera, J. 1986. Storage and survival of bacteria by ultra-free. *Letters in Applied Microbiology.* 3:127-129.

- Glandorf, D. C., Sluis, I., Anderson, A. J., Bakker, P. A. H. M. and Shippers, B. 1994. Agglutination, adherence, and root colonization by fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1726-1733.
- Hammer, D. E., Hill, D. S., Lam, S.T., Van Pee, K. H. and Ligón, J. M. 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.* 63.6:2147-2154.
- Harvey B. Jr., Fredrickson, J. K. and Elliot, L. L. 1993. Microbial ecology of the rhizosphere. In *Soil Microbial Ecology applications in agricultural and environmental management*. F. Blaine Metting, Jr (eds). Library of congress. New York, pp. 27-63.
- Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. 1978. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *R. fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopatology*. 69:480-482.
- Katsuwon, J. and Anderson, A. J. 1989. Response of plant colonizing *Pseudomonas* to Hydrogen Peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2985-2989.
- King, E., Ward, M. and Raney, D. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanina and fluorescin. *J. Lab. & Clin. Med.* 44:301-307.
- Kirner, S., Hammer P. E., Hill, D. S., Altmann, A., Fischer, L, Weislo, L J., Lanahan, M., Van Pee, K. H. and Ligón, J. M. 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal Bacteriology*. 190:1939-1943.
- Kleeberger, A., Castorph, A. H. and W. Klingmuller. 1983. The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to gram-negative bacteria. *Arch. Microbiol.* 136: 306-311.
- Lemanceau, R, Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras and Alabouvette, C. 1995. Effect of two plant species, flax (*Linum sitatissinum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mili.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61. 3:1004-1012.
- Lewis, J.A. and Papavizas, G.C. 1985. Effect of mycelial preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium* on population of *Rhizoctonia solani* and the incidence of damping-off. *Phytopatology*. 75:812-815.
- Loper J. E. and S. E. Lindow. 1994. A biological sensor for iron available to bacteria in their habitats on plant surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* vol 60.No 6: 1934-1941.
- Loper, J. E., Haack, C. and Scroth, M. N. 1985. Population dynamics of soil pseudomonas in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Appl. and Environ. Microbiol.* 49.2:416-422.
- Lynch J.M. 1990. *The Rhizosphere*. John Wiley & Sons. Chichester. England. pp 1-9.
- Merk. 1994. Manual de medios de cultivo, p. 56, 73-74, 106, 140-141. Darmstadt- Alemania
- Metcalf R. L and W.H. Luckmann.1994. Introduction to insect pest management. Jhon Wiley & Sons, INC. N.Y pp 9,249,443,515.
- Miller, H. J., Henken, G. and Van Veen, J. A. 1989. Variation and composition of bacterial populations in the rhizospheres of maize, wheat, and grass cultivars. *Can. J. Microbiol.* 35:656-660.
- Millus, E. A. and Rothrock, C. S. 1997. Efficacy of bacterial seed treatments for controlling *Pythium* root rot of winter wheat. *P/anfD/s*.81:180-184.
- Noel, R. K. and Holt, J. G. 1984. Gram-Negative aerobic rods and cocci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Williams & Wilkins. Baltimore, pp. 140-218.
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M. and Thomashow, L. S. 1997. Frequency of antibiotic-producing pseudomonas spp in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63. 3:881-887.
- Rainey, P., Bailey, M. and Thompson, 1.1994. Phenotypic and genotypic diversity of fluorescent pseudomonas isolated from field grown sugar beet. *Microbiology*. 140:2315-2331.
- Rodriguez, F. and Pfender, W. F. 1997. Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in vitro and in planta. *Phytopathology* 87:614-621.
- Rosales, A. M., Thomashow, L., Cook, R. J. and Mew, T. W. 1995. Isolation and Identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 85:1028-1032.
- Suslow, T. V and Schroth, M. N. 1982. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology*. 72:199-206.
- Thomashow, L. S., Weller, D. M., Bonsall, R. F. and Pierson III, L. S. 1990. Production of the antibiotic phenazine-1 -carboxylic acid by fluorescent pseudomonas species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 56. 4:908-912.
- Van Elsas, J. D., Van Overbeek, L. S., Feldman, A. M. Dulleman, A. M. and De Leeuw, O.1991. Survival of genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* in soil in competition with the parent strain. *FEMS Microbiol. Eco!*. 85:53-64.
- Van Overbeek, L. S. and Van Elsas, J. D. 1995. Root exudate-induced promoter activity in *Pseudomonas fluorescens* mutants in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 61.3:890-898.
- Yuen, G. Y, and Schroth, M. N. 1986. inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi by iron competition with an *Alcaligenes* sp. *Phytopathology* 76:171 -176.