

# “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE CEPAS DE BACILLUS, CONTRA AISLADOS AUTÓCTONOS DE FUSARIUM DE MAÍZ”.

**Trossero Rodrigo.**

*Facultad de Ciencias Agrarias – UNL.*

Director/a: Maumary Roxana. Codirector/a: Magliano Florencia.

Área: Ciencias Agrarias.

Palabras clave: Fusarium; Bacillus; Control.

## **Introducción:**

El cultivo de maíz (*Zea mays*) es uno de los cereales productores de granos y fibras más importantes a nivel mundial. Dentro de las principales limitaciones bióticas que presenta la producción de maíz, se reconocen las producidas por los hongos fitopatógenos del género *Fusarium*, debido a su amplia distribución tanto en suelos como en órganos de la planta, y su efecto en la pérdida de rendimiento y en la elaboración de metabolitos secundarios como mico toxinas.

El control biológico de patógenos de plantas y hongos toxigénicos ofrece una alternativa que puede complementar el control químico en el marco de un manejo integrado de plagas para reducir el impacto sobre los rendimientos y sobre la presencia de micotoxinas en alimentos y cadenas alimentarias. Frente a este panorama, y a la búsqueda de nuevas estrategias, las técnicas de control biológico, utilizando microorganismos para limitar el desarrollo de hongos en maíz, están siendo estudiadas y se están convirtiendo en el nuevo foco de la protección de cultivos a nivel mundial para el control de enfermedades. En la actualidad existe relativamente menor información sobre el estudio del control biológico sobre estos patógenos comparados con la investigación dedicada al estudio del control químico, e incluso se necesitan mayor cantidad de estudios sobre formulaciones, dosis, formatos tecnológicos y efectos de la aplicación de agentes de biocontrol sobre la microbiota nativa y contra los organismos patógenos.

Por lo tanto, respondiendo a la problemática del control de patógenos del género *Fusarium* de una forma amigable con el ambiente, que cumpla con los objetivos planteados por el manejo integrado de plagas, es que se plantearon los objetivos de este trabajo de estudio.

## **Objetivos:**

- a. Aislamiento e identificación de cepas autóctonas de *Fusarium* patógenas en maíz.
- b. Determinar la dosis infectiva de diferentes aislados autóctonos de *Fusarium* para plantines de maíz.
- c. Probar la actividad inhibitoria de las cepas autóctonas de *Bacillus* sp. en plantines de maíz, previamente inoculados con *Fusarium*.
- d. Determinar la actividad de enzimas hidrolíticas extracelulares y agentes sideróforos de los aislados de *Bacillus*.

e. Detectar la producción de compuestos con actividad antibiótica (ensayo de difusión en agar) para los aislados de *Bacillus*.

Título del proyecto: Control biológico de patógenos de suelo en cultivos agrícolas mediante el empleo de microorganismos autóctonos de la provincia de Santa Fe, Argentina.

Instrumento: CAID. Código: 50120150100153LI.

Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral.

Director/a: Maumary Roxana.

## Metodología

Se realizó el aislamiento de cepas patógenas autóctonas de *Fusarium* a partir de plantas de maíz que presentaron síntomas de enfermedades asociadas a este género. Se lograron aislar 10 cepas autóctonas de maíz, desde las espigas y los tallos, y se realizó caracterización fenotípica de las mismas.

Los síntomas que se siguieron para realizar el aislamiento de *Fusarium* corresponden a podredumbres de raíz y tallo, con presencia o no de micelio blanco o rosáceo, y en las espigas, granos de la punta con presencia de estrías blancas y presencia o no de micelio blanco o rosáceo. Al material extraído con síntomas, se le realizó la técnica de desinfección seriada, utilizando la metodología propuesta por Valverde et al., 2007 (inmersión en NaClO 1% por 5 min, inmersión en alcohol 70° por 2 min y 5 lavados con agua estéril) para eliminar microorganismos saprófitos de la superficie del material y se sembró en blotter test (cámaras de algodón y papel humedecidas, durante 7 días a 24 grados con alternancia de luz y oscuridad) para el desarrollo de los signos de la enfermedad. Cuando se desarrolló el micelio, se repicó en placas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado y se incubó durante 7 días a 24 grados con alternancia de luz y oscuridad. Se realizaron sucesivos repiques de las cepas hasta obtener micelio sin contaminaciones de otros patógenos o saprófitos. La caracterización fenotípica se llevó a cabo mediante la visualización de las colonias, medición del crecimiento y observación de conidios al microscopio, con estos pasos se determinó que el material aislado corresponde al género *Fusarium*.

Luego para la obtención de cultivos monospóricos de *Fusarium* sp en Placa de Petri se realizaron repiques de las cepas obtenidas en medio de cultivo APG y se las dejó crecer durante 24 horas, para luego realizar la extracción de un crecimiento único con un sacabocado. La extracción se realizó bajo lupa de 40X aumentos bajo el flujo laminar, y el crecimiento monospórico se repico sobre APG y se incubó durante 7 días a 24 grados con alternancia de luz y oscuridad. Se realizó observación de la morfología de las colonias y de la velocidad de crecimiento en placa de cada una de las colonias aisladas.

Cabe aclarar que las cepas que resultaron de mayor interés, se sometieron a extracción de ADN para llevar a cabo un proceso de PCR (Protocolo Uruguay de extracción rápida de ADN de hongos) para luego enviar a los resultados a laboratorios de identificación genómica para que los mismos sean identificados mediante técnicas de biología molecular.

Para la determinación de la dosis infectiva de *Fusarium*, con la colaboración del Ingeniero Químico Gabriel Vinderola, se realizó un raspado del patógeno (a partir de las cepas patógenas de *Fusarium*), luego la misma se cultivó en 200 mL de medio líquido SNA con y sin agitación a través de vortex, en Erlenmeyer de 1 litro. Cabe aclarar que también se llevó a cabo el cultivo del patógeno en medio sólido SNA, con el objetivo de realizar varios tratamientos que inciten al hongo a que genere estructuras de resistencia (conidios).

Se realizaron mediciones de los mismos con Cámara de Neubauer a las 2, 3, 4 y 5 semanas posteriores al inicio del cultivo del patógeno y en ninguna de las mismas se logró obtener la densidad de inóculo esperada de  $1 \times 10^8$  conidios/ml.

Para los demás tratamientos, se parte del mismo medio y posteriormente se diluye con el objetivo de lograr las densidades previamente estipuladas. (Tratamiento control (100 mL agua estéril); Tratamiento  $1 \times 10^4$  conidios/g (1 mL de solución – 99 mL de agua estéril); Tratamiento  $1 \times 10^5$  conidios/g (10 mL de solución – 90 mL de agua estéril); Tratamiento  $1 \times 10^6$  conidios/g (100 mL de solución – 0 mL de agua estéril)).

En ninguno de los tratamientos realizados se logró obtener la densidad esperada de  $1 \times 10^8$  conidios/ml por ende se optó por seguir la recomendación del fitopatólogo MSc. Roberto de Rossi, la misma consiste en realizar el cultivo del hongo en  $\frac{1}{4}$  de APD y en  $\frac{1}{5}$  de APD a  $25^\circ\text{C}$  para luego realizar las mediciones de densidad con cámara de Neubauer a las 2, 3, 4 y 5 semanas posteriores a la siembra del patógeno.

Luego el procedimiento consiste en rociar con 20 mL (pesando el rociador) 2 Kg tierra estéril, posteriormente la muestra se pasa a una bolsa para homogenizarla. Para finalizar, se reparte en vasos de telgopor, se siembran las semillas de maíz y las evaluaciones a realizar consisten en porcentaje de planta muertas (dumping off) y órganos necrosados en plántulas. Además se cortan trozos de plántulas con síntomas de daños y se realiza blotter test (cámaras húmedas en estufas a 24 grados con alternancia de luz y oscuridad), de los mismos para corroborar la infección del patógeno.

### **Resultados alcanzados**

Transcurrido el período de incubación, se determinaron 8 aislamientos del género *Fusarium* spp. A partir de estas cepas de *Fusarium* spp. se realizaron repiques de los mismos para poder realizar una adecuada caracterización. Con un sorbete se perforó el hongo a propagar contenido en la caja de Petri, y se sembró en ángulo recto en el centro de la placa (con medio de cultivo APG 2%), realizándose 3 repeticiones por aislamiento. Los aislamientos de *Fusarium* spp. se caracterizaron morfológicamente y se determinó su velocidad de crecimiento. Para caracterizar morfológicamente se observó pigmentación (en ambas caras de la caja de Petri), aspecto, textura y borde de la colonia, utilizando como guía a Booth (1977) (3) y Fernandez Valiela (1978) (17). Para determinar la velocidad de crecimiento se

midió el radio de avance de la colonia en cuatro puntos equidistantes del centro de la misma. Las mediciones se realizaron cada 12 horas hasta abarcar el 100% de la caja.

Respecto a la caracterización morfológica, lograron conformarse dos grupos de colonias de *Fusarium* spp. de acuerdo al color y aspecto del micelio. El primer grupo, conformado por 3 aislamientos, presentaron micelio de color blanco cremoso con micelio liso. Mientras que el segundo grupo, conformado por T3 los restantes aislamiento presentaron micelio de color salmón con micelio algodonoso.

Respecto del crecimiento, se pudo observar que las curvas de crecimiento micelial de las colonias de *Fusarium* spp. estudiadas en este trabajo, mostraron un buen ajuste al modelo característico del desarrollo microbiano, en donde se evidencia una primera fase de latencia que estaría asociada a la adaptación al medio de cultivo y la síntesis de enzimas que permiten la degradación y utilización de los nutrientes del medio; una segunda fase exponencial en la que se obtiene la velocidad máxima de crecimiento; y una tercera fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento disminuye.

Con respecto a la identificación molecular de los aislados obtenidos, las muestras se enviaron a caracterizar a Macrogen y aguardamos los resultados.

La próxima fase de este trabajo es probar y encontrar un medio de cultivo pobre en nutrientes donde los aislados obtenidos se estresen y produzcan estructuras cuantificables para realizar los ensayos de infectividad propuestos.

### **Bibliografía básica**

- **Degrarve, S.; Madege, R.; Audenaert, K.; Kamala, A.; Ortiz, J.; Kimanya, M.; Tiisekwa, B.; De Meulenaer, B.; Haesarty, G. 2015.** Impact of local pre-harvest management practices in maize on the occurrence of *Fusarium* species and associated mycotoxins in two agro-ecosystems in Tanzania. *Food Control*. 59, 225–233.
- **Etcheverry, M.; Scandolara, A.; Nesci, A.; Vilas Boas Ribeiro, M.; Pereira, P.; Battilani, P. 2009.** Biological Interactions to Select Biocontrol Agents Against Toxigenic Strains of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* from Maize. *Mycopathol* (2009) 167:287–295 DOI 10.1007/s11046-008-9177-1.
- **FAO, 2018.** Disponible en: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>. Acceso: 07/08/2018.
- **Jochum, C. C., L. E. Osborne, and G. Y. Yuen. 2006.** *Fusarium* head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes* strain C3. *Biol. Control* 39:336–344.
- **Kamala, A.; Kimanya, M.; Haesarty, G.; Tiisekwa, B.; Madege, R.; Degraeve, S.; Cryprian C.; Meulenaer, B. 2016.** Local post-harvest practices associated with aflatoxin and fumonisin contamination of maize in three agro ecological zones of Tanzania. *Journal: Food Addit Contam: Part A*. 33, 551-559.
- **Kharbikar, L.; Dickin, E.; Edwards, S. 2015.** Impact of post-anthesis rainfall, fungicide and harvesting time on the concentration of deoxynivalenol and zearalenone in wheat. *Food Addit Contam: Part A*. 12, 2015. DOI: 10.1080/19440049.2015.1084652.

- **Magliano M.F.1 ; Maumary R.1 ; Sillón M.1 y Vinderola G. 2** 1 FCA-UNL. 2 INLAIN (CONICET-UNL). B2-050 SELECCIÓN DE CEPAS AUTÓCTONAS DE *Bacillus* PARA CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium* EN MAÍZ: EFECTO IN VITRO DE *B. subtilis* 26.4 SOBRE *F. verticillioides*.
- **Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO.** *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. University Park and London: The Pennsylvania State University Press; 1983.
- **Pirgozliev, S.; Edwards, S.; Hare, M.; Jenkinson P. 2003.** Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European J. of Plant Pathol.* 109: 731–742, 2003.
- **Reid, L. 2005.** Screening Corn for Resistance to Common Diseases in Canada. Catalogue No.: A42-103/2005E-PDF ISBN: 0-662-40347-9.
- **Sadfi1, M. Chéřif1, 1. Fliss2, A. Boudabbous3 and H. Antoun2.** EVALUATION OF BACTERIAL ISOLATES FROM SALTY SOILS AND *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS FOR THE BIOCONTROL OF *FUSARIUM* DRY ROT OF POTATO TUBERS N.
- **Shu, X.; Livingston, D.; Franks, R.; Boston, R.; Woloshuk, C.; Payne, G. 2015.** Tissue-specific gene expression in maize seed during colonization by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Molecular plant pathol.* DOI: 10.1111/mpp.12224.
- **Wang, L.; Xie, Y.; Cui Y.; Xu, J.; He, W.; Chen, H.; Guo, J. 2015.** Conjunctively screening of biocontrol agents (BCAs) against *fusarium* root rot and *fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum*. *Microbiol Research.* 177, 34–42.