

Actividad antagónica de bacterias endófitas de *Leucocroton havanensis* Borhidi frente a hongos fitopatógenos



Antagonistic activity of endophytic bacteria from *Leucocroton havanensis* Borhidi against phytopathogenic fungi

<http://opn.to/a/Pofey>

Alexander Govin Sanjudo ^{1*}, Güendis Leal Sanabria ¹, Dayesi López Hernández ¹

¹Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Dpto. de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 # 455 e/ J e I Vedado, La Habana, Cuba.

RESUMEN: El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antagonista de cepas de *Bacillus*, endófitas de la planta hiperacumuladora de níquel *Leucocroton havanensis* Borhidi, frente a los hongos *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. y a tres especies del género *Fusarium*. Se determinó la producción de sideróforos, cianuro de hidrógeno (HCN) y de enzimas líticas como amilasas, proteasas y lipasas. La actividad antagonista de las bacterias, frente a los hongos fitopatógenos, se evaluó *in vitro* en un cultivo dual. Los porcentajes de inhibición del crecimiento se compararon mediante un análisis de varianza de clasificación simple, seguido de una prueba de Tukey. El 100 % de las cepas produjeron proteasas, amilasas y HCN; mientras que, 11 de ellas produjeron sideróforos. Todas las cepas afectaron el crecimiento de los hongos, durante el ensayo de antagonismo. La cepa *Bacillus* sp. ER11 mostró el mayor porcentaje de inhibición de los hongos, con valores superiores al 70 % en todos los casos.

Palabras claves: *Bacillus*, control biológico, *Alternaria alternata*, *Fusarium*, metabolitos bioactivos.

ABSTRACT: The objective of the study was to evaluate the antagonistic activity of *Bacillus* strains, endophytes of the nickel hyperaccumulator plant *Leucocroton havanensis* Borhidi, against the fungi *Alternaria alternate* (Fr.) Keissl. and three species of the genus *Fusarium*. The production of siderophores, HCN and lytic enzymes, such as amylases, proteases, and lipases, was determined. The antagonistic activity of the bacteria against the fungi were evaluated *in vitro* in dual culture. The inhibition percentages were compared by analysis of variance and Tukey's test. All strains produced proteases, amylases, and hydrogen cyanide (HCN), whereas 11 strains were detected to produce siderophores. All strains affected fungal growth in the antagonism test. The strain *Bacillus* sp. ER11 showed the highest percentages of fungal inhibition, more than 70% in all cases.

Key words: *Bacillus*, biologic control, *Alternaria alternata*, *Fusarium*, bioactive metabolites.

INTRODUCCIÓN

El incremento alarmante del número de plagas y enfermedades en las plantas producen crisis en los sistemas agrícolas y alimentarios. Además, inciden en la productividad y ponen en riesgo la seguridad alimentaria en las zonas afectadas, con consecuencias económicas, sociales y

ambientales (1). Los hongos constituyen una amenaza para la producción de alimentos; a su vez, causan grandes pérdidas en la calidad y cantidad de las cosechas. En este sentido, los géneros fúngicos *Fusarium* y *Alternaria* se encuentran entre los principales fitopatógenos que se reconocen por infectar a cultivos de interés económico como es el tomate (2,3).

*Autor para correspondencia: Alexander Govin Sanjudo. E-mail: agovin@fbio.uh.cu, agovin89@gmail.com

Recibido: 18/10/2018

Aceptado: 19/06/2019

El empleo sistemático de productos químicos en la agricultura provoca el resurgimiento de plagas, la contaminación del medio ambiente, problemas de salud animal y humana, así como la aparición de cepas resistentes a estos compuestos (4). La mejora de la productividad agrícola de forma sostenible, con el objetivo de cubrir la demanda creciente, constituye uno de los desafíos identificados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) para la estabilidad alimentaria y la disponibilidad de alimentos (1). Por esta razón, en los últimos años, se fomentan los estudios dirigidos al empleo de microorganismos antagonistas como controladores biológicos de estas plagas (5).

Leucocroton havanensis Borhidi (Euphorbiaceae), conocida comúnmente como “Cuaba Amarilla”, es una planta hiperacumuladora de níquel, endémica de Cuba. Esta especie está geográficamente restringida a los matorrales xeromórficos denominados cuabales, en suelos de serpentina o ultramáficos (6). Estos son ecosistemas con altas concentraciones de metales pesados como níquel, cromo y cobalto; además, poseen bajas concentraciones de nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo, potasio y calcio; por estas características se consideran ambientes extremos (7).

Las bacterias endófitas de las plantas hiperacumuladoras de metales se destacan por sus características de promoción del crecimiento vegetal (8,9). Estas bacterias protegen a las plantas contra el estrés abiótico, mediante la producción de sustancias poliméricas extracelulares y de enzimas antioxidantes. Además de la protección contra el estrés biótico, suprimen los daños provocados por los fitopatógenos, mediante la síntesis de metabolitos bioactivos como enzimas hidrolíticas, sideróforos y cianuro de hidrógeno (HCN) (10). Las especies del género *Bacillus* spp. se reconocen por su capacidad de producir metabolitos con actividad antifúngica, específicamente enzimas líticas y lipopéptidos, que poseen acción antagonista frente a un amplio espectro de fitopatógenos fúngicos (11).

Las poblaciones microbianas que habitan en ambientes extremos como son los suelos

ultramáficos son una fuente potencial de metabolitos bioactivos con impacto positivo en el desarrollo de la Biotecnología Agrícola y en la protección del medio ambiente (12). El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antagonista de bacterias endófitas de la planta hiperacumuladora de níquel *L. havanensis* frente a cuatro especies de hongos fitopatógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos empleados

Se utilizaron 12 cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus* (denominadas *Bacillus* sp. ER1 hasta ER12), endófitas de la planta hiperacumuladora de níquel *L. havanensis*. Todas estas cepas pertenecen a la colección de cultivos microbianos del Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Además, se emplearon cuatro cepas de hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Fusarium moniliforme* J. Sheld. F-22, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. F-29 y *Fusarium oxysporum* Schltdl. F-44, pertenecientes a la colección de microorganismos del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), gentilmente donadas a la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana.

Producción de sideróforos, HCN y enzimas líticas

La producción de sideróforos se determinó mediante el método del Cromo Azurol S (CAS) (13) inoculando los aislados en agar CAS. La presencia de un halo amarillo alrededor de las colonias bacterianas fue indicativa de la producción de sideróforos. Para determinar la producción de HCN se prepararon precultivos en caldo nutriente suplementado con 4,4 g.L⁻¹ de glicina, los que se incubaron a 150 rev.min⁻¹ durante 18 horas. Se inocularon placas del mismo medio modificado agarizado. En la tapa de cada placa, se colocó un papel de filtro Whatman no.1 al que se le añadió una solución de carbonato de sodio 2 % (p/v) y de ácido pícrico 0,5 % (p/v). Las placas se sellaron con parafilm e incubaron 96 horas a 28°C. El desarrollo de una coloración de naranja a rojo en el papel de filtro se consideró positivo a la producción de HCN (14).

La producción cualitativa de enzimas hidrolíticas extracelulares se realizó en medios sólidos con diferentes sustratos. La producción de lipasas se determinó en el medio Agar Nutriente suplementado con Tween 80; la de proteasas, en el medio Agar Leche y la producción de amilasas, en el medio Agar Almidón. La inoculación de los aislados se hizo mediante una estría en los medios y se incubaron durante cinco días a 28°C. Para la interpretación de los resultados se siguió las indicaciones de Harrigan y McCance (15).

Actividad antagonista *in vitro* frente a hongos fitopatógenos

La actividad antagonista de las bacterias endófitas de la planta hiperacumuladora de Ni, se determinó a través de un cultivo dual, en una relación de volumen de los medios fundidos de 50:50 de Agar Extracto de Malta y Agar LB. Cada bacteria se inoculó por triplicado en placas Petri de 90 mm de diámetro, formando un triángulo equilátero y en el centro se colocó un ponchete, de 5 mm de diámetro, de un cultivo de siete días del hongo fitopatógeno a evaluar (16). Las placas se incubaron por siete días a 28°C. La actividad antagónica se determinó por la comparación estadística de los diámetros de las colonias de los hongos en presencia y ausencia de los aislados bacterianos (testigo). Se determinó el porcentaje de inhibición teniendo en cuenta la siguiente ecuación (17):

$$I = [(R1 - R2) / R1] \times 100$$

donde:

- R1 - Promedio de las mediciones del diámetro de la colonia fúngica del testigo (hongo en ausencia de la bacteria).
- R2 - Promedio de las mediciones del diámetro de la colonia fúngica en presencia de la bacteria.
- I - porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico frente al aislado evaluado.

Para comparar los porcentajes de inhibición del crecimiento se utilizó un Análisis de varianza de clasificación simple, seguido de una prueba de comparación múltiple de medias Tukey con nivel de significación 0,05. Previamente se verificó el cumplimiento de las premisas de normalidad y homogeneidad de varianzas, con el empleo de las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene,

respectivamente. Los datos se transformaron a logaritmo antes de realizar los análisis estadísticos. Todos los análisis se realizaron con el empleo del programa STATISTICA versión 8.0 (StatSoft 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de sideróforos, HCN y enzimas líticas

Se produjeron sideróforos en 11 de las 12 cepas evaluadas, las que mostraron una coloración amarilla alrededor de las colonias bacterianas en el medio con Cromo Azurol S. Todas las cepas de *Bacillus* sp. produjeron HCN, amilasas y proteasas; mientras que, en nueve de los aislados se detectó la producción de lipasas. (Tabla 1)

El género *Bacillus* es uno de los más estudiados debido, fundamentalmente, a su abundancia en diferentes plantas y a la producción de una gran diversidad de metabolitos con actividad antimicrobiana (5,11). La producción de sideróforos en los endófitos es una característica común, ya que se desarrollan con bajos niveles de hierro en los tejidos de la planta (18). Esta característica se informó en todas las bacterias endófitas aisladas de las plantas hiperacumuladoras de níquel *Thlaspi goesingense* (Halácsy) F. K. Mey (19), *Alyssum serpyllifolium* Desf. (20) y *Noccaea caerulea* (J. Presl & C.Presl) F. K. Mey (8).

Los sideróforos son compuestos que actúan como agentes quelantes del Fe (III). Los microorganismos que producen sideróforos ofrecen doble beneficio para las plantas, pues evitan la proliferación de microorganismos patógenos y, a su vez, propician un aumento del crecimiento de la planta por la disponibilidad de Fe (III) (21).

El HCN es un metabolito secundario volátil que tiene potencialidades en el control biológico, en la supresión del desarrollo de patógenos, además de un inductor de la resistencia en las plantas (22). La producción microbiana de HCN se considera una importante característica antifúngica. El cianuro actúa como un inhibidor metabólico general (23). Esta característica se observó en bacterias endófitas de la planta *Mussaenda roxburghii* Hook.f., las cuales inhibieron también el crecimiento de los

Tabla 1. Producción de metabolitos bioactivos, por las cepas de *Bacillus*, endófitas de *L. havanensis*. / Production of bioactive metabolites by endophytic *Bacillus* strains from *L. havanensis*.

Cepas	Producción de		amilasas	proteasas	lipasas
	sideróforos	HCN			
ER1	+	+	+	+	+
ER2	+	+	+	+	+
ER3	+	+	+	+	-
ER4	+	+	+	+	-
ER5	+	+	+	+	+
ER6	+	+	+	+	+
ER7	+	+	+	+	+
ER8	-	+	+	+	-
ER9	+	+	+	+	+
ER10	+	+	+	+	+
ER11	+	+	+	+	+
ER12	+	+	+	+	+

patógenos fúngicos *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Sclerotinia sclerotiorum* (Purdy) (24).

Las enzimas hidrolíticas ayudan a las bacterias endófitas a colonizar la planta; la producción de proteasas, celulasas, amilasas y lipasas inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos (25). La producción de metabolitos con actividad antimicrobiana es una de las características de interés en las bacterias empleadas en el biocontrol de microorganismos fitopatógenos.

Actividad antagonista *in vitro* frente a hongos fitopatógenos

Las 12 cepas afectaron el crecimiento radial de los cuatro hongos (Fig. 1). En ocho de las cepas (ER1, ER2, ER5, ER6, ER9, ER10, ER11 y ER12) el porcentaje de inhibición de todos los hongos fue superior a 50 %. Este resultado puede deberse a la producción de metabolitos bioactivos con actividad antifúngica; característica que presentaron estas cepas. La sensibilidad de los hongos frente a las bacterias endófitas en orden decreciente fue: *Fusarium solani* F-29, *Fusarium oxysporum* F44, *Fusarium moniliforme* F-22 y *Alternaria alternata*.

La cepa ER8 mostró el menor efecto inhibitorio en el crecimiento radial de los cuatro hongos fitopatógenos. Esta es la única cepa, de las estudiadas, que no produce sideróforos y es una de las tres que no producen lipasas; estos son compuestos que tienen efecto inhibitorio en los hongos, por lo que la inhibición del crecimiento

fúngico, en este caso, debe estar dado por la producción de otros metabolitos.

El mayor efecto inhibitorio se observó en la cepa *Bacillus* sp. ER11, con valores superiores a 90 % de inhibición del crecimiento de los hongos *F. oxysporum* F-44 y *F. solani* F-29 y más de 70 % en *F. moniliforme* F-22 y *A. alternata*. Esto indica el potencial de esta cepa como antagonista de los fitopatógenos evaluados.

Los resultados de este estudio están en correspondencia con los que se informaron en la literatura para especies del género *Bacillus*. El potencial antagonista de *Bacillus subtilis* SCB-1, endófito de la caña de azúcar, productora de amilasas, proteasas, celulasas y sulfactina, se observó frente de a *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. SC6.2 y *Fusarium oxysporum* Schldtl. SC7.1 (11). La cepa *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 inhibió el crecimiento del *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Schldtl., tanto *in vitro* como *in vivo* en plantas de tomate. Esta cepa estimuló el crecimiento de las plantas y disminuyó considerablemente los síntomas de la enfermedad provocada por el patógeno (26). Las bacterias pueden provocar daños morfológicos en el micelio del hongo; estas alteraciones se observaron en *A. alternata* durante un cultivo dual con la cepa *Bacillus subtilis* ALICA productora de proteasas, glucanasas y quitinasas (17).

La prospección de microorganismos productores de metabolitos antifúngicos,

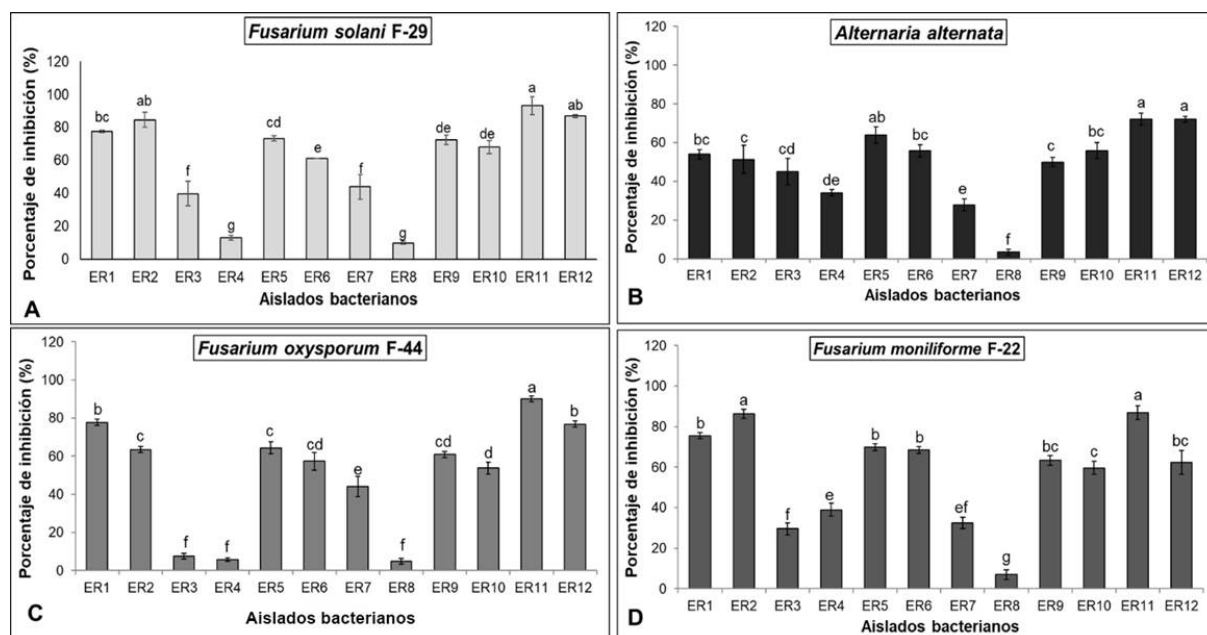


Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos: (A) *Fusarium solani* F-29, (B) *Alternaria alternata* F-13, (C) *Fusarium oxysporum* F-44 y (D) *Fusarium moniliforme* F-22, por las cepas bacterianas de *Bacillus* sp. / Percentage of growth inhibition of fungal phytopathogens: (A) *Fusarium solani* F-29, (B) *Alternaria alternata*, (C) *Fusarium oxysporum* F-44 and (D) *Fusarium moniliforme* F-22 by *Bacillus* sp. strains.

autóctonos de ecosistemas ultramáficos, reviste gran interés para la agronomía contemporánea. Este estudio reveló que las bacterias endófitas de la planta hiperacumuladora de níquel *L. havanensis* inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos y son una fuente de metabolitos bioactivos con potencialidades en el control de hongos fitopatógenos. Estas características convierten a estas bacterias en una potente herramienta para el desarrollo de un bioproducto con aplicación en el manejo integral de plagas.

REFERENCIAS

1. FAO. El futuro de la alimentación y la agricultura. Tendencias y desafíos. 2017; 20-23. <http://www.fao.org/publications>.
2. Sidharthan VK, Aggarwal R, Surenthiran N, Shanmugam V. Selection and characterization of the virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici isolate inciting vascular wilt of tomato. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2018; 7(2): 1749-1756.
3. Sharma RL, Ahir RR. Physiological studies of *Alternaria* causing *Alternaria* blight of tomato. Journal of Entomology and Zoology Studies. 2018; 6(6): 844-847.
4. Méndez JM, Flores MS, Páramo LA. Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos. Nexo Revista Científica. 2017; 30 (2): 96-110.
5. Mohamad OAA, Li L, Ma JB, Hatab S, Xu L, Guo JW, et al. Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* against *Verticillium dahlia*. Frontiers in Microbiology. 2018; 924: 1-14.
6. Alfonso D, Matrella S. Nickel hyperaccumulation in vitro by *Leucocroton havanensis* (Euphorbiaceae). Revista del Jardín Botánico Nacional. 2013; 34: 1-6.
7. Schedlbauer JL. Serpentine ecosystem responses to varying water availability and prescribed fire in the U.S. Mid-Atlantic region. Ecosphere. 2015; 6(7): 108. <http://dx.doi.org/10.1890/ES14-00528.1>
8. Visioli G, Vamerli T, Mattarozzi M, Sanangelantono AM. Cultivable endophytic bacteria enhance Ni translocation in the hyperaccumulator *Noccaea caerulea*. Chemosphere. 2014; 117: 538-544.
9. Xu JY, Han YH, Chen Y, Zhu LJ, Ma LQ. Arsenic transformation and plant growth promotion characteristics of As-resistant endophytic bacteria from As-hyperaccumulator *Pteris vittata*. Chemosphere. 2016; 144: 1233-1240.
10. Abla E, Souad E, Abdelhadi H, Bazdi O, Khadija O. Antagonistic activity of

- endophytic bacteria isolated from *Mentha rotundifolia* L. International Journal of Scientific and Technology Research. 2015; 4 (12): 36-39.
11. Hazarika DJ, Goswami G, Gautom T, Parveen A, Das P, Barooah M, et al. Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. BMC Microbiology. 2019; 19:71 <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1440-8>.
 12. Govin A, Coto O, Marrero J. Caracterización fenotípica de una colección bacteriana aislada del yacimiento laterítico Yagrumaje Norte, Moa, Cuba. Revista Cubana de Ciencias Biológicas. 2015; 4 (1): 69-77. ISSN 0253-5696.
 13. Sheng X, He L, Wang Q, Ye H, Jiang C. Effects of inoculation of biosurfactant-producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium-amended soil. Journal of Hazardous Materials. 2008; 155: 17-22.
 14. Sarvani B, Reddyn RS. In vitro screening of native *Bacillus* isolates for plant growth promoting attributes. International Journal of Bio-resource and Stress Management. 2015; 4(2): 298-303.
 15. Harrigan WF, McCance ME. Métodos de Laboratorio en Microbiología. Editorial Academia. España. 1968: 62-78.
 16. Villa P, Frías A, González G. Evaluación de cepas de *Pseudomonas* sp. para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. ICIDCA. 2005; 39 (3): 41-45. ISSN: 0138-6204.
 17. Abdelmoteleb A, Troncoso R, Gonzalez T, González D. Antifungal activity of autochthonous *Bacillus subtilis* isolated from *Prosopis juliflora* against phytopathogenic fungi. Mycobiology. 2017; 45(4): 385-391.
 18. Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, Gabbriellini R, Galardi F, Gonnelli C, et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. Microbial Ecology. 2007; 53(2):306-316.
 19. Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW, Sessitsch A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. Applied and Environmental Microbiology. 2004; 70 (5): 2667- 2677.
 20. Ma Y, Prasad M, Rajkumar M, Freitas H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. Biotechnology Advances. 2011; 29: 248-258.
 21. Dimkpa C. Microbial siderophores: Production, detection and application in agriculture and environment. Endocytobiosis and Cell Research. 2016; 27 (2): 7-16.
 22. Dasgupta D, Ghati A, Sarkar A, Sengupta C, Paul G. Screening of PGPR characters among microbial population isolated from rhizospheric soil of dhaincha (*Sesbania bispinosa*). International Journal of Recent Scientific Research. 2015; 6(3): 3069-3075.
 23. Sharifi-Noori MS, Saud HM, Azizi E. Evaluation of plant growth promoting rhizobacterias biocontrol agents for the control of blast disease in rice. Journal of Agricultural Science and Engineering. 2015; 1 (3): 135-142.
 24. Pandey PK, Samanta R, Yadav RNS. Plant beneficial endophytic bacteria from the ethnomedicinal *Mussaenda roxburghii* (Akshap) of Eastern Himalayan Province, India. Hindawi Publishing Corporation. Advances in Biology. 2015; ID 580510 <http://dx.doi.org/10.1155/2015/580510>.
 25. Amaresan N, Jayakumar V, Thajuddin N. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annum*) grown in coastal agricultural ecosystem. Indian Journal of Biotechnology. 2014; 13: 247-255.
 26. Shahzad R, Khan AL, Bilal S, Asaf S, Lee IJ. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. Peer J. 2017; 5:e3107; DOI 10.7717/peerj.3107.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)