



Bacillus sp. UY6A: una cepa aislada de nódulo de *Lupinus multiflorus* con características promisorias como agente de control biológico

Costa A¹, Corallo B², Amarelle A¹, Tiscornia S², Stewart S³, Pan D², Fabiano E¹

¹ Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM).

Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable". Ministerio de Educación y Cultura

² Sección Micología. Facultad de Ciencias-Facultad de Ingeniería. UdelaR

³ Programa Nacional de Cultivos de Secano, INIA- La Estanzuela

Introducción

Las enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos son responsables de ocasionar pérdidas devastadoras en cultivos agrícolas. Para disminuir el uso excesivo de pesticidas químicos, una de las estrategias empleadas consiste en el uso de agentes microbianos de control biológico. La microbiota presente en suelos saludables o asociada a las plantas contiene naturalmente microorganismos capaces de proteger a la planta de enfermedades y por lo tanto son ideales para la prospección de microorganismos con capacidad controladora. A partir de un nódulo radicalar de una planta saludable de *Lupinus multiflorus* colectada en un pastizal psamófilo de la localidad de La Pedrera en el departamento de Rocha, Uruguay, aislamos la cepa UY6A. El análisis de homología de la secuencia del gen 16S rRNA mostró que esta cepa pertenecía al género *Bacillus*, género que se caracteriza por contener especies bacterianas con capacidad de antagonizar diversos fitopatógenos

Objetivo

El propósito de este trabajo fue el de evaluar la capacidad de la cepa *Bacillus* sp. UY6A como posible agente de control biológico frente a hongos fitopatógenos.

Metodología y resultados

1. Afiliación filogenética de la cepa *Bacillus* sp. UY6A en base al análisis de la secuencia del gen 16s rRNA

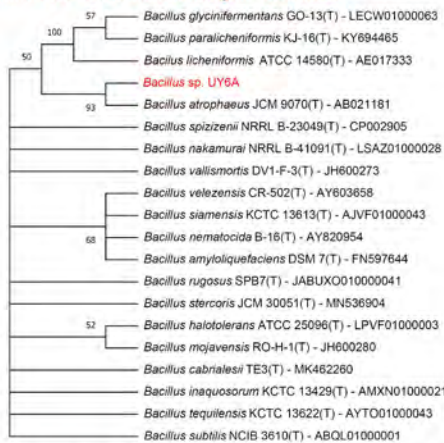


Fig 1. Se construyó un árbol filogenético con MEGA X en base a 19 secuencias del gen 16s rRNA pertenecientes a las cepas tipo mas cercanas respecto de la cepa UY6A obtenidas de EtBioCloud (<https://www.etbiocloud.net/>). Las relaciones internas al grupo de secuencias fueron inferidas mediante el método de máxima verosimilitud y el modelo Hasegawa-Kishino-Yano +G +I

2. Evaluación de la capacidad antagonica por metabolitos volátiles



Fig 2. Se tomaron discos con sacabocados a partir de cultivos puros de los patógenos y se inocularon en el centro de la placa con medio PDA. La bacteria se inoculó a partir de 100 µL de cultivo líquido fresco por rastreado en otra placa con medio PDA, ambas placas se enfrentaron y sellaron con Parafilm quedando el hongo en la placa superior. En la fila de arriba se muestra el control del hongo sin enfrentar a la UY6A mientras que en la fila de abajo se muestra el hongo enfrentado a la bacteria

3. Volatiloma UY6A

Compuesto ^a	TR (min) ^b	Área (%)
3-hydroxy-2-butanone (Acetoina)	3,997	59
3-methyl-2-pentanone	4,832	0,05
2-methyl- (Acido propanoico)	5,005	0,10
2,3-Butanediol	6,457	15,50
3-methyl- (Acido butanoico)	8,708	0,40
2-propyl-1-pentanol	17,922	0,18

Tabla 2. Compuestos volátiles relevantes producidos por la cepa UY6A en medio PDA detectados por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. ^a: Compuestos identificados mediante comparación contra librerías de referencia (NIST 08, Wiley 139).^b: Tiempo de retención

5. Otras características analizadas

Característica analizada	Fenotipo
Presencia gen <i>nifH</i>	-
Movilidad tipo swarming	+
Interacción con la nodulación de alfalfa por rizobio (<i>Smorhizobium meliloti</i> 242)	-
Coexistencia con <i>Bradyrhizobium elkanii</i> 1302 y 1301	+

Tabla 3. Ensayos realizados in vitro para la caracterización de rasgos varios. presencia del gen *nifH* mediante PCR; La movilidad tipo swarming fue evaluada en medio PDA agar 1.8%. Se evaluó la capacidad de la UY6A para coexistir con las cepas 1302 y 1301 de *Bradyrhizobium elkanii* incluidas en medio PDA agregando la UY6A en forma de gota.

4. Evaluación de la capacidad antagonica por metabolitos difusibles

Se seleccionaron cepas de hongos y oomicetes pertenecientes a la sección de Micología de Facultad de Ciencias y al Laboratorio de Fitopatología de INIA-La Estanzuela. Los inoculos de hongos y oomicetes (en forma de disco) se dispusieron en el centro de la placa, y la bacteria se inoculo con 3 estrias (en forma de línea) en placas con medio PDA.

Hongo/oomicete	Cultivo de aislamiento	Inhibición por difusibles
<i>Phytophthora sojae</i> Ps09	Soja	+ ²
<i>Phytophthora sojae</i> Ps11	Soja	+
<i>Phytophthora sojae</i> Ps25	Soja	+
<i>Phytophthora sojae</i> Ps28	Soja	+
<i>Phytophthora sojae</i> Ps35	Soja	+
<i>Phomopsis</i> sp. j83	Soja	+
<i>Phomopsis</i> sp. j87	Soja	++
<i>Phomopsis</i> sp. j664	Soja	++
<i>Phomopsis</i> sp. j821	Soja	++
<i>Phomopsis</i> sp. j429	Soja	++
<i>Macrophomina</i> sp j432	Soja	+
<i>Macrophomina</i> sp j629	Soja	+
<i>Macrophomina</i> sp j745	Soja	+
<i>Macrophomina</i> sp j746	Soja	+
<i>Macrophomina</i> sp j431	Soja	+
<i>Sclerotinia</i> sp. FI2525	Soja	++
<i>Sclerotium rolfsii</i> F11948	Remolacha	+
<i>Sclerotium</i> sp. 2527	Cannabis	+
<i>Rhizoctonia solani</i> Rz01	Soja	+
<i>Pythium</i> sp. Py03	Soja	-
<i>Pythium</i> sp. Py05	Soja	+
<i>Pythium</i> sp. Py06	Soja	+
<i>Pythium</i> sp. Py07	Soja	-
<i>Pythium</i> sp. Py10	Soja	-
<i>Fusarium graminearum</i> j73	Soja	++
<i>Fusarium graminearum</i> j117	Soja	++
<i>Fusarium graminearum</i> j174	Soja	++
<i>Fusarium graminearum</i> j346	Soja	++
<i>Fusarium graminearum</i> j660	Soja	++
<i>Fusarium graminearum</i> fg13000	Soja	++
<i>Fusarium graminearum</i> fg13001	Soja	++
<i>Fusarium graminearum</i> fg13002	Soja	++
<i>Fusarium graminearum</i> fg13003	Soja	++
<i>Fusarium graminearum</i> fg13006	Soja	++
<i>Fusarium oxysporum</i> j168	Soja	++
<i>Fusarium oxysporum</i> j175	Soja	++
<i>Fusarium oxysporum</i> j250	Soja	+
<i>Fusarium oxysporum</i> S564	Sorgo	++
<i>Fusarium oxysporum</i> j38	Soja	++
<i>Fusarium neocosporiellum</i> 1	Lupino	++

Tabla 3. Capacidad de inhibición del crecimiento del hongo/oomicete a los 8 días.

⁺: no se observa inhibición, + se observa inhibición, ++ mayor inhibición, ND no realizado.



Fig 3. Placas representativas de los resultados obtenidos en el ensayo de antagonismo por metabolitos difusibles..

Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que la cepa UY6A de *Bacillus* es un promisorio agente de control biológico. Es necesario profundizar en la caracterización de sus capacidades y mecanismos así como evaluar in vivo su capacidad de proteger a las plantas de la enfermedad producida por fitopatógenos

Agradecimientos

PEDECIBA Química y Biología FONTAGRO – proyecto ID30